



FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

“Bases moleculares de las mejoras
biotecnológicas conferidas a los vectores baculovirus
por el casete de expresión TB y su aplicación en la
producción de diferentes vacunas de subunidades”

Tesis Doctoral

Eva Guijarro Pardo

Madrid, 2016

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**“Bases moleculares de las mejoras
biotecnológicas conferidas a los vectores baculovirus
por el casete de expresión TB y su aplicación en la
producción de diferentes vacunas de subunidades”**

Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Ciencias por:

Eva Guijarro Pardo

Directores de Tesis:

José Ángel Martínez Escribano

Silvia Gómez Sebastián

Tutor Académico:

Filip Lim

El presente trabajo de Tesis ha sido realizado en el Dto. de Biotecnología del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias y Alimentarias mediante una beca para Formación de Personal Investigador otorgada por el Ministerio de Ciencia e Innovación (Subprograma FPI-INIA).

Agradecimientos

Después de estos 5 años desde que me incorporara al grupo en el que he desarrollado mi trabajo de Tesis, quisiera empezar agradeciendo al Dr. Escribano, mi director de tesis, la oportunidad de trabajar en su laboratorio y conocer a su grupo. José Ángel, espero haber cumplido aquellas palabras que te dije en mi entrevista (*“es verdad que no tengo mucha experiencia pero soy muy tenaz y trabajadora”*), porque he hecho todo lo posible para ello. Gracias por los consejos recibidos, sobre todo en la recta final cuando más dura se ve la meta. Seguidamente, quisiera agradecerle a mi directora de tesis, la Dr. Gómez-Sebastián, su entrega y dedicación a este trabajo. Gracias Silvia por transmitirme tu conocimiento y pasión por la Ciencia. Gracias por las revisiones, correcciones, planteamientos, consejos culinarios (¡con curso y kit de sushi incluidos!), porque todo ello ha sido muy importante tanto para mi trabajo como para mí.

En segundo lugar, quisiera agradecer al Departamento de I+D de la empresa Algenex S.L., donde realicé mis prácticas de máster y con el que después compartí físicamente laboratorio durante el desarrollo de mi tesis. En concreto a Carmen Nuñez (muchísimas gracias por toda la ayuda que me has brindado estos 4 años, gran parte de la práctica de esta tesis es gracias a la paciencia de Silvia, Javier y tuya; por esos momentos hasta “las tantas” en el laboratorio; por los comentarios sobre series, recetas, Carrusel Deportivo... anécdotas que guardaré con mucho cariño), Susana Martínez (una de las compañeras más afable con las que he trabajado, dispuesta a “echarte un cable” en lo que hiciese falta y siempre con una sonrisa. ¡Muchas gracias!), a Benoit Dudognon y a Javier López, a quien nunca podré agradecer lo suficiente los sabios consejos con los cultivos de insecto que me diste cuando coincidimos en el laboratorio (¡con la “guerra” que me han dado!); porque, junto con Ana, teníais razón: *“la tesis es un 90% lectura y un 10% práctica”* ¡Muchas gracias por todo!. También quisiera agradecer al Departamento de Producción de Algenex S.L. por su inestimable ayuda: muchísimas gracias Carmen, Miguel y Edel por vuestro trabajo, vuestra disposición y por no tener en cuenta mis despistes con las solicitudes de servicio y demás errores.

Seguidamente, me gustaría agradecer a todo el Departamento de Biotecnología del INIA, por haberme acogido y trabajado conmigo durante estos 4 años. Al laboratorio de la Dr. Alonso, quien ha sido siempre amable conmigo: a Lucía Barrado (aunque hemos coincidido al final de mi tesis, quisiera agradecerte que seas única, mi compañera de *test* de galletas y vueltas ciclistas de regreso a casa; sabes que te echo en falta tanto como tú a mí en esas tardes de “pasillo vacío”; gracias por hacer que la etapa más dura de mi tesis fuera más divertida y más agradable. Ve preparando la mochila que nos vamos de “viaje de fin de tesis”), Inmaculada Galindo (muchísimas gracias por toda la ayuda que me has brindado y por las risas compartidas en cultivos o tomando un café), Miguel Ángel Cuesta (porque *statements* como “lo que el FIFA te lo da, el FIFA te lo quita” y “a Inma le sale todo” han marcado mi tesis; gracias por las charlas filosóficas y risas en el cuarto de cultivos. Espero que allá donde vayas no tengas que volver a buscar “el único oocito de la preparación”...si te vuelve a tocar, sabes que puedes contar conmigo), Raquel Moreno (a quien estoy muy agradecida por ser mi cobijo, literal, y mi apoyo durante mi estancia en las tierras americanas), Inmaculada Dalmau (por los buenos momentos que pasamos en tu última etapa de tesis y el principio de la mía, con caminatas por el bosquecillo incluidas) y Marta Cabezas (con quien

compartí buenos momentos durante titulaciones y purificaciones de virus). Me gustaría agradecer también al personal de los laboratorios de Inmunología con los que he convivido estos 5 años: a María Yuste (mi gran compañera de carreras: mil gracias por todos los consejos y charlas, por nuestras carreras; por mostrarme que no hay quebradero de cabeza que no se supere subiendo la Cuesta de la jara. Ahora que ya por fin está finalizada la tesis, ¡nos vamos a por los 42 km!), a Belén y Conchi por su simpatía, su buena disposición en mis momentos de “agonía” con el citómetro y por los buenos momentos y risas compartidos junto a un café o comiendo; a Paloma porque pese “ir siempre a 100 km/h” tiene una actitud positiva y una sonrisa con ella, a Teresa (“Teresilla”, porque da gusto ver la ilusión de los primeros años de tesis ¡no la pierdas que el camino es largo! Muchas gracias también por tu ayuda con el citómetro), a Elena (ese restaurante vegetariano de Segovia... ¡Inolvidable!), a Zoraida y Carmen: muchísimas gracias porque siempre que tuve algún problema con el citómetro estuvisteis ahí para ayudarme sin importar el trabajo que tuvieseis entre manos. Gracias a Maite, Janin y María L. (por vuestros ánimos sobre todo en la etapa de escritura; tampoco olvidaré que “*la clave con los vaccinia está en tener un buen chupete*”); a Estela, Ana, Ángela y Teresa (inolvidables momentos de “trámites y papeleos” en la embajada, te deseo lo mejor con el final de la tesis, ¡ánimo!); a Paloma Encinas y a Blanca (sabes que poco a poco te vendrás al *lado oscuro del running*). Para finalizar me gustaría agradecer a Lourdes, Carmen y Vicky, las secretarías con las que he coincidido, por ayudarme siempre con los trámites burocráticos: gracias porque siempre lo habéis hecho de buen grado a pesar de mi torpeza o mis prisas con “el papeleo”. Por último, pero que ocupa un lugar importantísimo en mi trabajo, no sólo por todas las soluciones, tampones, antibióticos preparados, las “10000 esterilizaciones” del material de cultivos sino también por las almendras y demás frutos de tu tierra, me gustaría agradecer su profesionalidad y su amabilidad a Margarita, nuestra técnico, porque ya lo sabes, eres una *crack*. También me gustaría agradecer al Dr Risatti (UConn), al Dr Lim (UAM) y a la Dr Passarelli (KSU) por la realización de mi estancia, el seguimiento de mi tesis y participación en los seminarios de su departamento, y la amable cesión de la alícuota del suero anti-IE1 utilizado en este trabajo, respectivamente.

Por otro lado, me gustaría dar las gracias a mis amigos. A Ana (que me ayudaste en lo que pudiste cuando los inicios de mi carrera resultaban inciertos; por ese abrazo enorme el día que me concedieron la beca que difícilmente olvidaré. Tenías razón: “*90% lectura...*”), a Belén, David, Lara, Lucía, Diana y Juanjo por su paciencia y apoyo durante estos años; *especialmente*, a Sara, porque nuestros entrenamientos durante la escritura de mi Tesis han sido un gran apoyo. Gracias también a toda la gente que he conocido durante el desarrollo de este trabajo de Tesis y que, sin dudarlo, han contribuido de manera alguna a él (Manú, Isabel, Berta, Nerea, Silvia, Sergio, Miguel, Neibla, Jingjing, Kalpanie, Marco, Dr Levin).

Quisiera agradecer a mis amigas de la universidad Marta, Sandra y Silvia, por estar “a las duras y a las maduras” siempre conectadas pese a la distancia y/o la diferencia horaria; por simplemente ser geniales y darme vuestro apoyo, risas y reflexiones; al fin este “parto” ha llegado a buen puerto. Muchísimas gracias *CUATRIPARTIT*.

Y a Guillermo, por “haber querido jugar este partido” conmigo desde ya hace algunos años, aunque los últimos minutos han sido duros y pese a ello, sigues contando conmigo en el equipo. Gracias por ser como eres, complementándome, y seguir siendo otro de mis pilares incondicionales (“*Qui marche lentement...*”).

Para finalizar, me gustaría dar las gracias INFINITAS a mi familia, mi otro gran apoyo. Gracias a Javier, por aguantar a esta hermana tuya tan pesada cuando tú eres el talento y yo sólo la constancia; a mi padre, por esos entrenamientos *bici-running* para darle otra perspectiva a los resultados y por enseñarme a aprender de todo, sacando siempre algo positivo; y a mi madre, por ser una trabajadora increíble y la persona más generosa que conozco; si tengo este tesón y perseverancia es gracias a ti. Querría dedicarle este trabajo de tesis a mis abuelos (de parte de “*vuestra perla blanca del Turia*”) y, en especial, a mi abuela María Dulce, porque de ella aprendí el respeto y el amor incondicional que siento por los animales que me llevó a estudiar Biología y, en definitiva, a llegar hasta hoy.

Hoy cierro la puerta de una etapa, pero estoy deseando explorar la ventana que se abre tras ella...

“Nunca te das cuenta de lo que has hecho; sólo puedes ver lo que queda por hacer”

Marie Curie (1864-1934)

Resumen

Desde su descripción como una tecnología de expresión transitoria alternativa para la producción de proteínas recombinantes a comienzos de los años 80, el Sistema de Expresión basado en el uso de Vectores Baculovirus (BEVS) se ha alzado como una tecnología puntera para la producción de proteínas heterólogas en un ambiente eucariótico. En contraposición con los largos procesos de producción de proteínas recombinantes en cultivos celulares de mamífero, el uso de BEVS reduce considerablemente tanto los tiempos de desarrollo como los costes asociados al proceso productivo. Sin embargo, las consecuencias de la replicación vírica en las células hospedadoras, como el efecto citopático que degrada progresivamente todo el contenido intracelular incluyendo a la proteína heteróloga de interés, han supuesto diferentes inconvenientes que han disminuido su competitividad a la hora de ser adoptada universalmente por la industria farmacéutica. Además, esta degradación intracelular es concomitante con la actividad óptima del promotor vírico que regula la expresión de la proteína de interés, provocando su acumulación en formas aberrantes o degradadas o la disminución en la eficiencia del mecanismo de su secreción. Todo ello contribuye a una disminución significativa de la funcionalidad de la proteína producida o de su propia acumulación dentro o fuera de la célula. No obstante, numerosas proteínas recombinantes han sido producidas eficientemente mediante BEVS, reflejadas en el creciente nº de artículos científicos publicados y en el empleo de esta tecnología en la producción industrial, representado por la aprobación de algunas moléculas derivadas de células de insecto para su uso en salud humana y veterinaria, principalmente en el campo de las vacunas. Esto resalta la importancia del estudio y desarrollo de estrategias que superen las limitaciones de este sistema de expresión recombinante. Respecto a las mejoras realizadas sobre el vector baculovirus, los vectores modificados con el casete de expresión denominado TB, han supuesto un avance significativo en términos de calidad y cantidad de las proteínas recombinantes expresadas debido a la reducción del efecto citopático que muestran las células de insecto infectadas con estos vectores respecto al uso de vectores baculovirus convencionales. El mantenimiento de la viabilidad de las células infectadas con el vector TB durante un mayor tiempo post-infección permite una mayor acumulación de proteína recombinante y una mejora de su procesamiento post-traducciona. Pero, hasta el momento no se había descrito el mecanismo por el cual el casete TB provoca estos efectos en las células infectadas. Por ello, el objetivo de este trabajo de Tesis ha sido investigar las bases moleculares de los cambios observados con los vectores TB. Además, se ha caracterizado la expresión óptima de proteínas complejas mediante vectores TB, tradicionalmente consideradas difíciles de expresar correctamente en este sistema de expresión. Para ello, se seleccionó una glicoproteína y una proteína estructural auto-ensamblable, capaz de conformar VLPs (*virus-like particles*), ambas de interés comercial. Los resultados obtenidos en este trabajo han permitido concluir que los elementos reguladores genéticos incorporados al casete TB retrasan el disparo de la señal apoptótica en las células infectadas, retardando la aparición de los efectos citopáticos y la degradación de los elementos intracelulares y mejorando el rendimiento productivo y la calidad de los modelos proteicos expresados obtenido respecto a los cultivos celulares infectados con un vector baculovirus convencional.

Abstract

Since its description as a newly expression technology for transiently production of heterologous proteins in the early 80's, the Baculovirus Expression Vector System is a transient technology that is being risen as a breakthrough technology for the production of proteins of interest in a eukaryotic environment. Opposite to the long-time consumption procedures related with mammalian cells, the use of the Baculovirus Expression Vector System remarkably reduces the manufacturing times and the production-associated costs. However, the consequences of viral replication inside the host cells, such as the cytopathic effect which progressively degrades all the intracellular content including the recombinant protein of interest, have meant different withdraws and this technology has occasionally been out of the scope of the pharmaceutical industry. Moreover, this highest intracellular degradation occurs concordantly with the optimal promoter activity showed by the viral promoter controlling the expression of the heterologous protein. This implies a negative effect on the recombinant protein expression, which can lead into aberrant protein folding, protein aggregates accumulation or a low secretion yield which means severe deleterious effects on the protein global production. Nevertheless, several proteins has been produced with this technology over the last 30 years, being some of them approved for human and animal health care proposes like immunogens. This statement highlights the importance of studying and promoting any improvement on it. Regarding this, a number of strategies have been proposed to overcome the described limitations. Focusing on the baculovirus vector, the recently described TB cassette has supposed a significant advance in terms of quantity and quality of the expressed proteins due to the reduced cytopathic effect displayed by the infected cell cultures when comparing with those infected with a conventional baculovirus vector. Thus, the maintenance of sustained-viable TB-infected cells allows a higher expression rates combined with better quality and leading to a wider expression window. However, it has never been described how a TB-modified baculovirus vector causes these effects on the infected cells. So the main propose of this PhD dissertation is to describe the mechanism/s by which the TB cassette induces the mentioned effects. In addition, we decide to test the potency of expression of this newly baculovirus vector in the production of complex proteins of interest, such as glycoproteins or self-assembling proteins, like those conforming pseudo-viral particles (VLPs), those are commonly used like immunogens in health care purposes. The described results obtained in this PhD dissertation lead to conclude that the genetic regulatory elements presented in TB-improved vectors delay the apoptotic trigger, which retard the cytopathic effect and the degradation of the intracellular elements in the TB-infected cells. These effects, in combination with the highly-strong promoter region located in the TB cassette that controls the expression of the recombinant protein, allow a significant increase in the production yields of the complex heterologous proteins selected in this dissertation when comparing to those yields achieve in cell cultures infected with conventional baculovirus vectors.

Lista de abreviaturas

Lista de abreviaturas

Aa: aminoácido/s	to-Bac® (Invitrogen) utilizado como control respecto al vector baculovirus mejorado TB. El promotor que regula la proteína heteróloga en cada construcción generada para el vector convencional es el promotor <i>polihedrina</i>
AcMNPV: virus de la nucleopoliedrosis múltiple de <i>Autographa californica</i>	CPE (Cytopathic Effect): efecto citopático
AIV (<i>A influenza virus</i>): virus de la influenza subtipo A	D.O.: densidad óptica
Akt/PKB (<i>Protein Kinase B</i>): proteína quinasa B o Akt	DDR (<i>DNA damage response</i>): respuesta celular a daño en ADN
ARN: ácido ribonucleico	<i>E.coli</i> : <i>Escherichia coli</i>
ATM (<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>) proteína quinasa mutada en de la enfermedad ataxia telangiectasia ,	ELISA (<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>): ensayo inmunoenzimático de absorción
ATR (<i>ataxia telangiectasia and Rad3-related protein</i>): proteína quinasa relacionada con la ataxia telangiectasia y con la proteína Rad-3	EMA (<i>European Medicines Agency</i>): Agencia Europea del Medicamento
BEVS (<i>Baculovirus Expression Vectors System</i>): sistema de producción de proteínas recombinantes basado en el uso de vectores baculovirus.	ER (<i>Endoplasmic Reticulum</i>): retículo endoplasmático
BmNPV: virus de la nucleopoliedrosis de <i>Bombyx mori</i>	FDA (<i>Food and Drug Administration</i>): Administración Regulatoria Americana de Medicamentos y Comida
BV (<i>Budded virion</i>): forma fenotípica brotante/desnuda del virión de baculovirus	GFP (<i>Green Fluorescent Protein</i>): proteína verde fluorescente
cADN: ácido desoxirribonucleico complementario	GOI (<i>Gene Of Interest</i>): gen de interés definido como el cADN codificante para una proteína heteróloga candidata a ser expresada
Caspasas: proteasas de corte en aspartato dependientes de cisteína	<i>H. cecropia</i> : <i>Hyalophora cecropia</i>
cIAP (<i>cellular Inhibitor of Apoptosis Protein</i>): homólogo celular de proteína inhibidora de la apoptosis vírica	<i>H. virescens</i> : <i>Heliothis virescens</i>
Convencional: vector baculovirus recombinante generado a través del sistema Bac-	HA ¹⁸⁻⁵²⁹ : proteína Hemaglutinina del virus de Influenza PR/8/34/H1N1 (para este trabajo de tesis, referido a su dominio globular que comprende los aa 18-529)
	Hpi: horas post-infección

hr (*homologous regions*): regiones homólogas

HSV-1: virus *Herpes simplex* tipo 1

IAP (*Inhibitor of Apoptosis Protein*): proteína inhibidora de la apoptosis de baculovirus

iARN: ARN interferente

IE (*Immediately-Early Protein*): proteína de expresión inmediatamente temprana

IF: inmunofluorescencia

kDa: kilo-Daltons

KDEL: señal de retención en retículo endoplásmico compuesta por los aminoácidos

LEF: (*Late Expression Factors*): factores víricos necesarios para la expresión de los genes tardíos

mARN: ácido ribonucleico mensajero

ME: microscopía electrónica

MOI (*Multiplicity Of Infection*): multiplicidad de infección

NAb (*Neutralizing Antibodies*): anticuerpos neutralizantes

OB (*Occlusion Bodies*): cuerpos de oclusión

ODV (*Occluded-derived virion*): forma fenotípica del virión de baculovirus liberada desde los cuerpos de oclusión

OMS: Organización Mundial de la Salud

OpMNPV: virus de la nucleopoliedrosis múltiple de *Orgyia pseudotsugata*

ORF (*Open Reading Frame*): secuencias de lectura abierta

PCR (*Polymerase Chain Reaction*): reacción en cadena de la polimerasa

PFU (*Plaque Forming Units*): unidades formadoras de placa

PI3K (*Phosphoinositide 3-kinase*): enzima fosfoinositol-3-quinasa

Polh: promotor de la proteína de expresión muy tardía de baculovirus, *polihedrina*

PSC: *Protein Sciences Corporation*

PS-Mel: adición del péptido señal de la proteína melitina de la abeja melífera (*Apis mellifera*) a la secuencia codificante interés

R. nu Rachiplusia nu

rAAV: virus adeno-asociado recombinante

rARN: ácido ribonucleico ribosómico

RE: retículo endoplásmico

RHDV (*Rabbit Haemorrhagic Disease Virus*): virus de la enfermedad hemorrágica del conejo

RT-PCR (*Reverse Transcription-PCR*): reacción de transcripción reversa acoplada a una PCR

S.frugiperda o Sf: *Spodoptera frugiperda*

SNPV (*Single Nucleopoliedro virus*): virus de la nucleopoliedrosis simple donde el ODV se compone de una única nucleocápside recubierta por su envoltura

SpltNPV: virus de la nucleopoliedrosis de *Spodoptera litura*

TB: casete de mejora de vectores baculovirus TopBac®

T_m (*melting temperature*): temperatura a la que los cebadores se unen a las hebras de ADN molde complementarias durante una PCR

T.ni: Trichoplusia ni

UAF: unidades arbitrarias de fluorescencia

VLPs (*Virus Like Particles*): partículas pseudovíricas recombinantes

Vs: versus

WB (*Western Blot*): inmunomarcaje de proteínas en membranas de nitrocelulosa o PVD.

Índice

Agradecimientos	5
Resumen	11
Abstract	15
Lista de abreviaturas.....	19
Índice	25
Introducción.....	31
1. Características generales de los baculovirus	33
2. Regulación del genoma vírico: replicación y transcripción	33
2.1. Replicación del genoma de baculovirus	34
2.1.1. Orígenes de replicación	34
2.1.2. Mecanismos de replicación del ADN vírico.....	34
2.2. Transcripción del genoma de los baculovirus	35
2.2.1. Genes de expresión temprana.....	35
2.2.1.1. IE1.....	35
2.2.1.2. IE0.....	37
2.2.2. Genes de expresión tardía.....	38
2.2.3. Genes de expresión muy tardía	38
3. Estructura del virion y ciclo infectivo de los baculovirus	38
4. Impacto de la infección por baculovirus en las células de insecto	41
4.1. Respuesta a daño en ADN o DDR	41
4.2. Arresto traduccional	42
4.3. Apoptosis	43
4.3.1. Cascada apoptótica en células de insecto.....	43
4.3.2. Proteínas anti-apoptóticas descritas en baculovirus.....	45
4.3.2.1. P35	45
4.3.2.2. IAP	46
4.4. Activación de rutas de proliferación y supervivencia celular	47
5. Sistema de expresión de proteínas heterólogas basado en vectores baculovirus	47
5.1. Ventajas del uso del sistema BEVS en la expresión de proteínas recombinantes	48
5.2. Limitaciones del sistema BEVS	49
5.3. Limitaciones del sistema BEVS	50
5.4. Aplicaciones biotecnológicas de los baculovirus	52
Objetivos	55
Materiales y Métodos.....	59
1. Ácidos nucleicos.....	61
2. Cepas bacterianas.....	68
3. Cultivos celulares.....	70
4. Virus recombinantes	70
5. Electroforesis de proteínas.....	72
6. Electrotransferencia de proteínas	72
7. Inmunodetección de proteínas	72
8. Análisis y caracterización de proteínas recombinantes.....	74
9. Microscopía.....	77
10. Determinación bioquímica de la viabilidad de los cultivos infectados	78
11. Purificación de partículas víricas de baculovirus	78
12. Fraccionamiento subcelular	78
13. Detección fluorimétrica de actividad caspasa	79
14. Detección de activación de rutas de proliferación y supervivencia	80
15. Análisis estadístico.....	81

Resultados	83
1. Caracterización de la sobre-expresión del cADN <i>Ac-ie-01</i> presente en el vector TB en el contexto de la infección de células de insecto.....	85
2. Caracterización del retardo en la aparición del efecto citopático (CPE), denominado <i>efecto protector</i> , observado en cultivos celulares infectados con el vector TB respecto a los infectados con el vector Convencional.....	87
2.1. Estudio del <i>efecto protector</i> en relación a la viabilidad e integridad del cultivo infectado	87
2.3. Estudio comparativo de la activación de la apoptosis en su fase efectora en cultivos de insecto infectados con el vector TB respecto de los infectados con el vector Convencional.	91
2.3.1 Caracterización de la cinética de activación de caspasas efectoras (<i>Sf-caspasa-1</i>)	91
2.3.2. Caracterización de la cinética de activación de caspasas iniciadoras (<i>Sf-Dronc</i>)	93
2.4. Agentes responsables del <i>efecto protector</i> celular en infecciones con el vector TB.....	94
2.4.1. Estudio de la implicación de la proteína anti-apoptótica P35.....	94
2.4.2. Estudio de la implicación de otras proteínas anti-apoptóticas en la infección con el vector TB relacionadas con su <i>efecto protector</i> en células de insecto.	95
2.4.3. Estudio del efecto de la infección del vector TB sobre la transcripción de otros genes de la célula huésped.	96
3. Efecto de la infección del vector TB sobre células de insecto a nivel de activación de rutas de proliferación y supervivencia celular	97
3.1. Cinética de crecimiento poblacional en cultivos infectados con el vector TB.....	97
4. Caracterización del papel que juegan cada uno de los transactivadores para los que codifica el cADN <i>Ac-ie-01</i> en infecciones con el vector TB.....	99
4.2. Caracterización del <i>efecto protector</i> celular en infecciones con los vectores TB-B y TB-C.....	101
4.3. Cinética de crecimiento poblacional en cultivos infectados con los vectores TB-B y TB-C	103
4.4. Efecto de los vectores TB-B y TB-C a nivel de expresión de una proteína heteróloga modelo en células de insecto infectadas	104
5. Aplicación de vectores TB para la producción de proteínas de interés vacunal	106
5.1. Comparación de la expresión y secreción de la proteína HA ¹⁸⁻⁵²⁹ mediante infecciones con los vectores Convencional y TB recombinantes.....	106
5.1.1. Producción de la proteína HA ¹⁸⁻⁵²⁹ en combinación con el péptido señal de la proteína melitina	106
5.1.2. Producción de la proteína HA ¹⁸⁻⁵²⁹ en combinación con el tetrapéptido KDEL.....	110
5.2. Estudio comparativo de la producción de VLPs de RHDV mediante la expresión de la proteína VP60 en infecciones de cultivos celulares de insecto con los vectores Convencional y TB	113
Discusión.....	117
1. Caracterización de la sobre-expresión de <i>Ac-IE01</i> en cultivos infectados con el vector TB	119
2. Caracterización del <i>efecto protector</i> celular de la infección con el vector TB.....	120
2.1. <i>Efecto protector</i> sobre las mitocondrias de las células de insecto infectadas con el vector TB	121
2.2. <i>Efecto protector</i> celular del vector TB sobre la activación de la ruta apoptótica	122
2.3. Estudio de los agentes responsables del <i>efecto protector</i> en células infectadas con el vector TB	124
3. Efecto de la infección con el vector TB sobre rutas de proliferación y supervivencia celular	127
4. Caracterización del efecto de la sobre-expresión individual de las proteínas <i>Ac-IE0</i> e <i>IE1</i> sobre cultivos celulares de insecto	128
5. Validación del vector TB para la expresión de glicoproteínas recombinantes en BEVS	130
5.1. Producción de HA-AIV como glicoproteína modelo de interés	130
5.1.1. Producción de la proteína HA ¹⁸⁻⁵²⁹ en conjunción con PS-Mel	130
5.1.2. Producción de la proteína HA ¹⁸⁻⁵²⁹ KDEL.....	133
5.2. Producción de VP60-RHDV como modelo de proteínas formadoras de VLPs.....	134
Conclusiones.....	135
Bibliografía.....	139
ANEXO I: Material Suplementario	183

1. Tablas	185
2. Figuras Suplementarias	187
ANEXO II: Publicaciones.....	197

Introducción

1. Características generales de los baculovirus

Los baculovirus son un grupo muy diverso de virus que se caracterizan por poseer un genoma circular, de doble cadena de ADN, super-enrollado que puede presentar un tamaño de 80-180 kb y codificar para 90-180 genes. Su genoma altamente condensado está empaquetado en nucleocápsides con su característica forma de bastón, de entre 200 y 300 nm de longitud y entre 30-60 nm de diámetro (Blissard and Rohrmann 1990, O'Reilly, Miller et al. 1994, Arif, Bonning et al. 2011, Ferrelli, Berretta et al. 2012, Rohrmann 2013). Presentan un rango de hospedador muy estrecho y los mejor caracterizados son los que infectan a los lepidópteros, himenópteros y dípteros, en los que se han descrito dos fenotipos del virus, el virion extracelular (BV) y el virion ocluido en el cuerpo de oclusión (ODV) (Blissard and Rohrmann 1990, King and Possee 1992, O'Reilly, Miller et al. 1994, Kelly, King et al. 2007, Theilmann and Blissard 2008, Ferrelli, Berretta et al. 2012, Rohrmann 2013). Concretamente, estos cuerpos de oclusión son otra de sus características distintivas, siendo estructuras de resistencia a condiciones ambientales adversas para la supervivencia del virus (Ferrelli, Berretta et al. 2012, Rohrmann 2013) y principalmente formadas por matrices paracristalinas compuestas por las proteínas Polihedrina o Granulina (originando estructuras conocidas como poliedros o gránulos, respectivamente). Dentro de estas estructuras resistentes, las nucleocápsides del virion pueden presentarse envueltas de manera individual (*SNPV*) o compartiendo envoltura con varias nucleocápsides (*MNPV*) (O'Reilly, Miller et al. 1994, Rohrmann 2013) y, pese a carecer de valor taxonómico, este criterio es tan descriptivo que se sigue utilizando en su nomenclatura (Rohrmann 2013). La clasificación de los baculovirus más aceptada es la que establece cuatro grandes géneros en función al hospedador al que infectan y a la homología de secuencias genómicas (Tabla S-1) (Jehle, Blissard et al. 2006, Arif, Bonning et al. 2011). Dentro de los baculovirus pertenecientes al grupo de los Alfabaculovirus, se distinguen dos subgrupos en función a la proteína que media la entrada y salida de los viriones (Zanotto, Kessing et al. 1993, Pearson and Rohrmann 2002): el Grupo I, donde está mediado por la glicoproteína GP64 (Blissard and Wenz 1992, Monsma, Oomens et al. 1996, Hefferon, Oomens et al. 1999, Oomens and Blissard 1999, Zhou and Blissard 2008), y el Grupo II, donde está regulado por la proteína F (Pearson, Groten et al. 2000). Al Grupo I de los Alfabaculovirus pertenece el primer baculovirus del que se obtuvo la secuencia completa de su genoma, el *AcMNPV* (Ayres, Howard et al. 1994), que posee 134 kb y que codifica para 150 ORFs (Figura S-1), siendo el arquetipo de su género (Ayres, Howard et al. 1994, Arif, Bonning et al. 2011) y el modelo en el que este trabajo de Tesis se centrará para la descripción del resto de características de esta familia vírica.

2. Regulación del genoma vírico: replicación y transcripción

El genoma de los baculovirus se caracteriza por un contenido bajo en CG, por no presentar generalmente agrupaciones génicas (Ayres, Howard et al. 1994, van Oers and Vlak 2007) y por presentar hasta 4 genes que experimentan procesamiento alternativo de su mRNA (Chisholm and Henner 1988, Chen, Zhong et al. 2013).

2.1. Replicación del genoma de baculovirus

Se ha descrito que la replicación del genoma de los baculovirus se comienza a detectar a partir de las 6 hpi para continuar hasta las 18 hpi, momento desde el cual declina (Friesen 1997).

2.1.1. Orígenes de replicación

En el genoma de los baculovirus se han descrito unas secuencias ricas en AT, caracterizadas por ser elementos repetitivos que contienen reiterados motivos palindrómicos en su núcleo central, denominadas regiones *hr* que, además de estar relacionadas con procesos de estabilidad o plasticidad genómica (van Oers and Vlak 2007), funcionan como origen de replicación (Kool, van den Berg et al. 1993, Kool, Voeten et al. 1993, Leisy and Rohrmann 1993). Además, se han identificado otras secuencias que también pueden funcionar como orígenes de replicación, tales como secuencias ricas en AT y en secuencias repetitivas presentes como copia única en el genoma (Lee and Krell 1992, Kool, Voeten et al. 1993, Kool, Goldbach et al. 1994, Huang and Levin 1999, Habib and Hasnain 2000), o incluso algunas secuencias promotoras (Wu and Carstens 1996, Wu, Liu et al. 1999) o regiones codificantes de ciertos genes de expresión temprana (Wu, Wu et al. 2014).

2.1.2. Mecanismos de replicación del ADN vírico

Algunos trabajos han propuesto su replicación por medio del círculo rodante (Kool, Voeten et al. 1993, Kool, Ahrens et al. 1995, Oppenheimer and Volkman 1997), mientras que otros refuerzan la implicación de procesos de recombinación (Martin and Weber 1997, Hajos, Pijnenburg et al. 2000, Okano, Vanarsdall et al. 2006, Okano, Vanarsdall et al. 2007, Mikhailov and Rohrmann 2009). De manera combinatoria, existen trabajos que sugieren que la replicación del vADN sea llevada a cabo a través de un mecanismo híbrido que requiera la interacción entre ambos procesos (Wu and Carstens 1996, Wu, Liu et al. 1999), pero aún se desconoce el mecanismo exacto seguido para la replicación del vADN de los baculovirus. Pese a ello, se sabe que para la replicación del genoma de los baculovirus es esencial la participación de ciertas proteínas como LEF-1(primasa), LEF-2 (proteína de unión a primasa), LEF-3 (proteína de unión a ADN de cadena simple), P143(helicasa) y ADN polimerasa vírica (Kool, Ahrens et al. 1994) revisado en (Kelly, King et al. 2007, Rohrmann 2013), así como la participación de otras no esenciales como P35 (Kool, Ahrens et al. 1994, Hefferon and Miller 2002). Además, dado que las *hr* pueden funcionar como orígenes de replicación, es posible que otras proteínas que interaccionen con estas secuencias, como la proteína IE1(Kool, Ahrens et al. 1994, Lu and Miller 1995), de la que hablaremos con más detalle más adelante, puedan participar en algunos casos en el proceso de replicación a través del reclutamiento de la maquinaria proteica necesaria.

2.2. Transcripción del genoma de los baculovirus

Los genes de los baculovirus se expresan de una manera secuencial y coordinada en forma de cascada temporal regulada a nivel transcripcional (Blissard and Rohrmann 1990, Friesen 1997). Así, se puede dividir la transcripción y expresión génica en tres fases: temprana, tardía y muy tardía.

2.2.1. Genes de expresión temprana

La expresión de los genes tempranos tiene lugar antes de que se haya producido la replicación de vADN y se sub-divide en genes de expresión inmediatamente temprana (no requieren la presencia de proteínas víricas sintetizadas *de novo*) y temprana-tardía (requieren la presencia de proteínas inmediatamente tempranas) (Kelly, King et al. 2007, Ferrelli, Berretta et al. 2012, Rohrmann 2013). Los genes de expresión temprana se caracterizan porque sus mARN pueden ser detectados justo después de la infección celular (0,25-2 hpi, (Friesen and Miller 1987, Chisholm and Henner 1988, Krappa and Knebel-Morsdorf 1991), presentando un pico de expresión máxima en torno a 6-12 hpi que posteriormente declina coincidiendo con el comienzo de la expresión de los genes tardíos, aunque hay genes de expresión temprana que presentan también expresión tardía (*ie1*, *p35*, *gp64*, *efp*, *39K*) (Friesen 1997). Generalmente codifican para proteínas implicadas en la regulación génica, de la respuesta del hospedador, de la replicación del vADN y en la expresión de los genes tardíos (Kelly, King et al. 2007, Theilmann and Blissard 2008, Rohrmann 2013). Como la expresión de estos genes están regulada por la ARN polimerasa del hospedador (Grula, Buller et al. 1981, Fuchs, Woods et al. 1983), generalmente presentan secuencias promotoras parecidas a las presentes en los genes del huésped regulados por esta enzima (Kelly, King et al. 2007, Ferrelli, Berretta et al. 2012, Rohrmann 2013) y suelen acompañarse de elementos potenciadores en *cis* (Guarino, Gonzalez et al. 1986, Guarino and Summers 1986, Theilmann and Stewart 1992, Rodems and Friesen 1993, Lu, Krell et al. 1997) como las regiones *hr*. Estas secuencias *hr* se hallan dispersas por todo el genoma de algunos baculovirus (Figura S-1) (Cochran and Faulkner 1983, Ayres, Howard et al. 1994), y posteriormente se ha observado que este efecto es independiente de la naturaleza del promotor al que regula (Viswanathan, Venkaiah et al. 2003). Aunque, es en conjunción con factores transactivadores víricos como mejor potencian la expresión de la secuencia génica a la que regulan (Guarino and Summers 1986, Kovacs, Guarino et al. 1991, Ribeiro, Hutchinson et al. 1994, Choi and Guarino 1995, Pearson and Rohrmann 1997, Theilmann, Willis et al. 2001, Huijskens, Li et al. 2004) . De entre los principales factores transactivadores descritos en baculovirus, describiremos las proteínas IE1 e IE0 por su relevancia en este trabajo de Tesis.

2.2.1.1. IE1

El factor transactivador IE1 es una proteína de ≈ 67 kDa de expresión inmediatamente temprana que mantiene unos niveles constantes de expresión a lo largo de la infección gracias a elementos reguladores de su promotor (Kovacs, Guarino et al. 1991, Theilmann and Stewart 1993, Choi and Guarino 1995, Pullen and Friesen 1995, Lu, Du et al. 2003). Esta proteína que potencia la actividad de ciertos

promotores de actividad temprana y tardía, incluyendo al suyo propio (Guarino and Summers 1986, Kovacs, Guarino et al. 1991, Passarelli and Miller 1993, Kremer and Knebel-Mörsdorf 1998, Ono, Sato et al. 2015). Además, la proteína IE1 puede trabajar de manera coordinada con las *hr*, con las que interacciona directa o indirectamente y aumenta así su función transactivadora (Guarino and Summers 1986, Guarino and Dong 1991, Kovacs, Guarino et al. 1991, Ribeiro, Hutchinson et al. 1994, Choi and Guarino 1995, Rodems, Pullen et al. 1997). En contraposición, se ha descrito que la proteína IE1 presenta una función reguladora negativa (Leisy, Rasmussen et al. 1997) sobre los promotores de los genes *ie0* (Kovacs, Guarino et al. 1991) e *ie2/ie-n* (Carson, Summers et al. 1991), aunque hay trabajos que discuten dicha regulación negativa (Ribeiro, Hutchinson et al. 1994, Huijskens, Li et al. 2004, Ono, Sato et al. 2015). Como interacciona con las regiones *hr*, se cree que la proteína IE1 podría estar implicada en el reclutamiento de factores que propiciarían la replicación del vADN (Rodems and Friesen 1995, Friesen 1997, Rohrmann 2013). Además, se ha observado que, ya sea por su participación directa o indirecta, la expresión transitoria de la proteína IE1 induce apoptosis concomitante a la replicación del vADN en células de insecto (Prikhod'ko and Miller 1996, LaCount and Friesen 1997, Prikhod'ko and Miller 1999, Schultz, Wetter et al. 2009, Schultz and Friesen 2009).

Dentro de los 582 aa que constituyen esta proteína, las funciones de transactivación y de interacción con las regiones *hr* están físicamente separadas (Figura 1) (Kovacs, Choi et al. 1992, Rodems, Pullen et al. 1997). Su extremo N-terminal está compuesto por dos dominios ácidos de transactivación (AAD) y un pequeño dominio básico (DBI) necesario para la interacción con las *hr* (Slack and Blissard 1997, Forsythe, Shippam et al. 1998, Pathakamuri and Theilmann 2002, Olson, Wetter et al. 2003, Taggart, Mitchell et al. 2012). En el extremo C-terminal, se localizan un dominio con motivo “hélice-bucle-hélice” y otro dominio básico (DBII), encargados de la dimerización, el transporte a núcleo y la interacción con el ADN (Kovacs, Choi et al. 1992, Rodems, Pullen et al. 1997, Forsythe, Shippam et al. 1998, Okano, Mikhailov et al. 1999, Olson, Wetter et al. 2001, Theilmann, Willis et al. 2001, Olson, Wetter et al. 2002, Olson, Wetter et al. 2003). Excepto durante su dimerización citoplasmática (Olson, Wetter et al. 2002), la proteína IE1 co-localiza con el vADN y con las proteínas necesarias para su síntesis en las factorías víricas que se constituyen en el núcleo de la célula huésped (Okano, Mikhailov et al. 1999, Ito, Sahri et al. 2004, Nagamine, Saito et al. 2015). En *OpMNPV*, la proteína IE1 se ha localizado en el virión tipo BV, pudiendo estar implicada en la aceleración de la expresión génica temprana tras el “desensamblaje” de virión recién internalizado en la célula huésped (Theilmann and Stewart 1993). Sin embargo, en *AcMNPV* el factor IE1 parece no estar asociado al BV (Choi and Guarino 1995, Wang, Deng et al. 2010), resultado que algunos autores relacionan con la variabilidad de los protocolos ejecutados o la fragilidad de la proteína (Braunagel, Russell et al. 2003, Wang, Deng et al. 2010).

2.2.1.2. IE0

Esta proteína procede del procesamiento alternativo del mRNA *ie1*, originando otro factor de 72 kDa con idéntica secuencia a la proteína IE1 excepto por los 54 aa extra que posee en su región N-terminal (Figura 1 y S-2) (Chisholm and Henner 1988, Kovacs, Guarino et al. 1991). Pese a compartir la mayor parte de su secuencia con la proteína IE1, el patrón de expresión de la proteína IE0 queda estrictamente restringido a tiempos tempranos de la infección en AcMNPV, con un pico de máximo de expresión de mRNA entre las 2-4 hpi para seguidamente desaparecer (Chisholm and Henner 1988, Kovacs, Guarino et al. 1991, Pullen and Friesen 1995, Lu, Du et al. 2003). También presenta localización nuclear (Okano, Mikhailov et al. 1999, Olson, Wetter et al. 2002, Luria, Lu et al. 2012, Nagamine, Saito et al. 2015) y unido a su gran homología de secuencia, se ha sugerido que o bien podrían desempeñar las mismas funciones que la proteína IE1 interactuando de manera sinérgica, o por el contrario, las proteínas IE0 e IE1 podrían presentar una interacción antagónica (Kovacs, Guarino et al. 1991, Pearson and Rohrmann 1997, Theilmann, Willis et al. 2001, Dai, Willis et al. 2004, Huijskens, Li et al. 2004, Stewart, Huijskens et al. 2005, Sokal, Nie et al. 2014). Ambos modelos de interacción serían posibles puesto que se ha descrito que en AcMNPV, las proteínas IE0 e IE1 pueden funcionar como homodímeros o heterodímeros a través de la interacción IE1-IE1, IE0-IE0, e IE0-IE1, siendo la cantidad de cada proteína el factor determinante del tipo de dímero (Kremer and Knebel-Mörsdorf 1998, Theilmann, Willis et al. 2001, Huijskens, Li et al. 2004). Además, la ORF de *ie01* de los virus AcMNPV y OpMNPV presenta sitios de transcripción interna que permiten la expresión de transcritos de IE1, produciéndose a partir de una sola secuencia codificante (*ie01*), dos proteínas (IE0, IE1) (Theilmann, Willis et al. 2001, Huijskens, Li et al. 2004) (Figura S-2). Adicionalmente, las dos proteínas son esenciales en el contexto infeccioso, siendo letal su doble delección para la replicación vírica y se necesita el rescate de ambas para la obtención de los mismos niveles de producción de BV, replicación de vADN y producción de poliedros que los obtenidos por el virus silvestre (Huijskens, Li et al. 2004, Stewart, Huijskens et al. 2005, Sokal, Nie et al. 2014). No obstante, cuando sólo se rescata la doble delección generando virus mutantes que sólo o predominantemente expresan la proteína IE0, se observa un retraso en el efecto proteolítico y la muerte celular de los cultivos asociada a la infección (Stewart, Huijskens et al. 2005, Sokal, Nie et al. 2014), que curiosamente coincide con el retraso en la aparición del CPE observado en infecciones con baculovirus recombinantes que sobre-expresan el cADN de *Ac-ie-01* (Gómez-Sebastián, López-Vidal et al. 2014, Lopez-Vidal 2014).

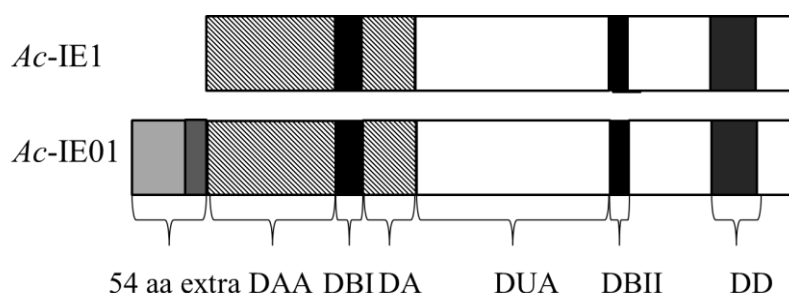


Figura 1: Estructura de los diferentes dominios la secuencia peptídica de los factores transactivadores Ac-IE1 y Ac-IE0. Abreviaturas: 54 aa extra (38 aa Exon 0+ 16 aa secuencia líder de *Ac-ie-1*), DAA: dominio de activación ácido, DBI: dominio básico I, DA: dominio ácido, DUA: dominio de unión a ADN; DBII: dominio básico II, DD: dominio de dimerización. Adaptado de (Theilmann, Willis et al. 2001, Nie, Fang et al. 2009, Taggart, Mitchell et al. 2012).

2.2.2. Genes de expresión tardía

Estos genes codifican principalmente para proteínas estructurales de la cápsida y el inicio de su expresión está marcada por la replicación del vADN, la inhibición transcripcional de mARN del hospedador, la activación de la vARN polimerasa (Blissard 1996) y los eventos de compactación y recubrimiento del vADN desnudo recién sintetizado con la proteína vírica básica P6.9 (Rohrmann 2013). Además, se sabe que su correcta expresión requiere la presencia de veinte factores víricos (Lu and Miller 1995, Todd, Passarelli et al. 1995, Todd, Passarelli et al. 1996, Rapp, Wilson et al. 1998, Huijskens, Li et al. 2004).

2.2.3. Genes de expresión muy tardía

Su expresión está regulada por promotores que presentan su máxima actividad en torno a las 20 hpi, encontrando dentro de esta categoría a los genes que codifican para las proteínas Polihedrina y P10, que presentan niveles de expresión muy superiores a cualquier otro gen vírico (Smith, Summers et al. 1983, Blissard 1996, Kelly, King et al. 2007, Theilmann and Blissard 2008, Rohrmann 2013). Aunque también se transcriben por la ARN polimerasa vírica que regula la expresión de genes tardíos (Huh and Weaver 1990, Glocker, Hoopes et al. 1993), sus elevados niveles de expresión se deben a la presencia en sus promotores de una secuencia consenso rica en AT (secuencia amplificadora o *Burst*) que permite su hiper-expresión (Qin, Liu et al. 1989) y a la que se une el transactivador VLF-1 (*Very-Late Factor 1*), (Yang and Miller 1999, Mistretta and Guarino 2005).

3. Estructura del virion y ciclo infectivo de los baculovirus

Los baculovirus se caracterizan por presentar un ciclo replicativo bifásico donde predominantemente intervienen una de sus dos formas fenotípicas (Blissard 1996, Slack and Arif 2007, Theilmann and Blissard 2008, Ferrelli, Berretta et al. 2012, Rohrmann 2013). El BV (Figura S-3.A) y el ODV (Figura S-3.B) comparten la estructura de sus nucleocápsides, principalmente compuestas por la

proteína VP39 (Thiem and Miller 1989) y el genoma que contienen, altamente condensado por la interacción con la proteína P6.9 (Wilson, Mainprize et al. 1987) (Figura 2). Sin embargo, los dos tipos de virion difieren en el momento del ciclo replicativo del virus en el que participan así como en la composición y origen de sus envolturas (Figura 2) (Slack and Arif 2007, Theilmann and Blissard 2008, Ferrelli, Berretta et al. 2012, Rohrmann 2013).

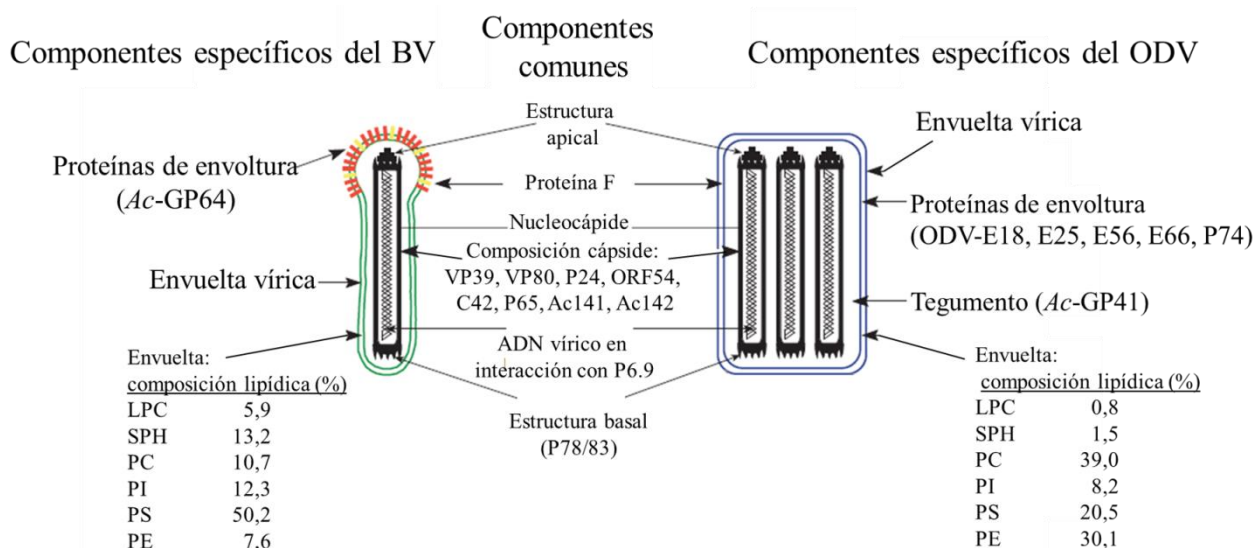


Figura 2: Formas fenotípicas características del virion de *AcMNPV*. Esquema detallado de la composición del virión extracelular (BV) y el virión ocluido (ODV). Entre las dos formas fenotípicas del virion, se denota los componentes semejantes (nucleocápsides y genoma) así como los difentes (envuelta). Abreviaturas LPC, lisofosfatidilcolina; SPH, esfingomielina; PC, fosfatidilcolina; PI, fosfatidilinositol; PS, fosfatidilserina y PE, fosfatidiletanolamina Adaptado de (Theilmann and Blissard 2008).

Los ODV son los encargados de llevar a cabo la denominada infección primaria (Figura 3, flecha azul), proceso que llevan a cabo gracias a la protección conferida por los poliedros (Figura S-3.C) que les permite permanecer activos hasta ser ingeridos junto al alimento por una larva susceptible. Al alcanzar el intestino medio los poliedros se desintegran debido a su sensibilidad al pH alcalino predominante en este ambiente y los ODV embebidos en ellos son liberados (Possee and King 1992, Blissard 1996, Slack and Arif 2007, Theilmann and Blissard 2008, Ferrelli, Berretta et al. 2012). Mediante la acción de las enzimas asociadas al poliedro, los ODV atraviesan la membrana peritrófica (Slack and Arif 2007) e infectan las células del epitelio columnar del intestino medio (Figura 3, 4 hpi) (Theilmann and Blissard 2008). En el interior, las nucleocápsides son transportadas hacia el núcleo mediante la polimerización de actina (Lanier and Volkman 1998, Ohkawa, Volkman et al. 2010, Au, Wu et al. 2013).

Tras acceder a él por los complejos del poro nuclear (Theilmann and Blissard 2008, Au, Wu et al. 2013, Fay and Pante 2015), las nucleocápsides se desensamblan y el vADN comienza los eventos de transcripción y replicación que permitirán el ensamblaje de las nuevas nucleocápsides en el núcleo de la célula infectada (King and Possee 1992, Blissard 1996, Theilmann and Blissard 2008, Ferrelli, Berretta et al. 2012, Au, Wu et al. 2013). Desde las 7-8 hpi las nucleocápsides recién ensambladas comienzan a brotar

del núcleo y atraviesan el citoplasma hasta alcanzar las zonas de la membrana plasmática en las que se han ido insertando proteínas víricas como la glicoproteína GP64 (King and Possee 1992, Blissard 1996, Rohrmann 2013). Allí, las nucleocápsides adquieren su envoltura a partir de la membrana plasmática originando los nuevos viriones BV (Figura S-3.A), que emergen de la célula huésped por un proceso mediado por la proteína GP64 (Oomens and Blissard 1999, Zhou and Blissard 2008). Estas partículas son liberadas a la hemolinfa y se encargan de diseminar la infección sistémica y en cultivos celulares (King and Possee 1992, Monsma, Oomens et al. 1996, Rohrmann 2013) a través de un proceso de endocitosis mediado por clatrina (Long, Pan et al. 2006), completando así el ciclo de infección secundaria (Figura 3, flecha roja). Durante la generación de nuevas nucleocápsides, hay una proporción de las mismas que no egresa del núcleo sino que se mantiene retenida en él y a partir de las 24 hpi, empiezan a adquirir una envoltura derivada de la modificación de la membrana nuclear de la célula huésped mediante la inserción de proteínas víricas, originando los ODV (Figura S-3.B) (King and Possee 1992, Slack and Arif 2007, Theilmann and Blissard 2008). A tiempos muy tardíos del ciclo replicativo del virus y tras la producción de los componentes de formación de los poliedros (Figura S-3.C), los ODV se embeben en ellos mediante el proceso de oclusión (Theilmann and Blissard 2008, Ferrelli, Berretta et al. 2012, Rohrmann 2013). La lisis nuclear se produce cuando todo el núcleo de la célula huésped queda relleno de poliedros y se ha formado una estructura fibrilar compuesta por la proteína P10 (Williams, Rohel et al. 1989) (Figura 3, 24-120 hpi). Muerta por el proceso infectivo, la larva infectada se desintegra por acción de las proteínas víricas catepsina y chitinasa, (Hawtin, Zarkowska et al. 1997), diseminándose los poliedros y estableciéndose un nuevo ciclo de infección (King and Possee 1992, Slack and Arif 2007, Ferrelli, Berretta et al. 2012, Rohrmann 2013).

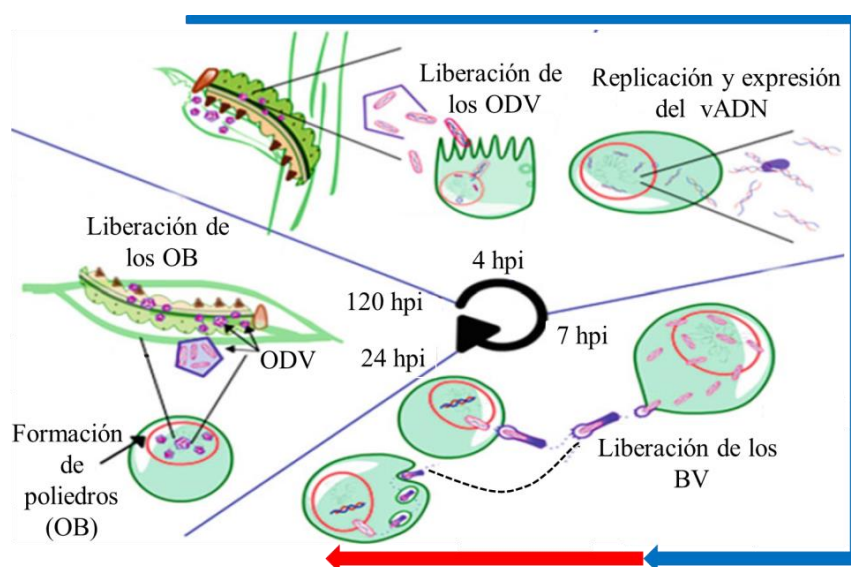


Figura 3. Esquema del ciclo infeccioso bifásico de los baculovirus en las larvas de lepidópteros. Los baculovirus presentan un ciclo de infección representado por dos etapas (infección primaria, flecha azul, e infección secundaria, flecha roja), principalmente distinguibles por el tipo de propagación (intra o inter-larvas) y el fenotipo del virion que la lleva a cabo (ODV o BV). (Figura adaptada de (Palomares, Realpe et al. 2015)).

4. Impacto de la infección por baculovirus en las células de insecto

Al igual que en otros virus (White and Fenner 1994, Mathews 1996, Cann 2005), la consecución satisfactoria del ciclo replicativo de los baculovirus en su hospedador induce cambios fenotípicos en la célula infectada. De manera concomitante con la iniciación de la replicación del vADN (8-10 hpi), se detectan los primeros rasgos citopáticos de la infección en células de insecto (Blissard and Rohrmann 1990, Williams and Faulkner 1997, Monteiro, Carinhas et al. 2012), como la hipertrofia nuclear o el empleo de elementos del citoesqueleto para beneficio del virus (Blissard and Rohrmann 1990, Williams and Faulkner 1997, Lanier and Volkman 1998, Fang, Nie et al. 2009, Ohkawa, Volkman et al. 2010, Au, Wu et al. 2013). Estos efectos junto con la activación de diversos mecanismos de defensa celulares y la acción lesiva de ciertas proteínas víricas (Williams, Rohel et al. 1989, van Oers, Flipsen et al. 1993, Hawtin, Zarkowska et al. 1997, Naggie and Bentley 1998, Hom, Ohkawa et al. 2002, Wang, Deng et al. 2010), provocan la desintegración nuclear y la lisis de la célula infectada (Williams and Faulkner 1996, Williams and Faulkner 1997, Clarke and Clem 2003, Rohrmann 2013). Existe una amplia variedad de respuestas celulares frente a la infección por baculovirus, de las cuales detallaremos la activación de la respuesta al daño en el ADN (DDR), el arresto de la biosíntesis de proteínas del hospedador a nivel traduccional, la apoptosis y la activación de rutas de proliferación y supervivencia, por su especial relevancia para los desarrollos seguidos en este trabajo de Tesis.

4.1. Respuesta a daño en ADN o DDR

La DDR es una vía canónica de detección y reparación de daños en el ADN, disparada por roturas en moléculas de ADN de cadena simple o doble, señalizada por las quinasas ATM y ATR, pertenecientes a la superfamilia de las quinasas relacionadas con la PI3K, que fosforilan diferentes proteínas diana relacionadas con la maquinaria de replicación del ADN, el arresto del ciclo celular y la apoptosis (Cimprich and Cortez 2008, Seviour and Lin 2010). Se ha descrito su papel activo en defensa de la célula huésped frente a la multiplicación vírica (Weitzman, Lilley et al. 2010), de tal manera que distintos virus han evolucionado para manipular este tipo de vías de DDR en favor de su replicación, (Lilley, Schwartz et al. 2007, Chaurushiya and Weitzman 2009), entre los que también se encuentran los baculovirus (Huang, Wu et al. 2011, Mitchell and Friesen 2012, Mitchell, Byers et al. 2013). Se ha observado que la replicación del vADN de baculovirus en células de *Spodoptera*, activa a las quinasas implicadas en la activación de la DDR, activando en consecuencia otras rutas (Huang, Wu et al. 2011). Aunque el proceso de replicación del vADN de baculovirus aún no está completamente esclarecido, se cree que las estructuras intermedias generadas durante el mismo podrían asemejarse a fragmentos de ADN dañados, provocando que la célula huésped dispare la DDR. Una vez activada, los baculovirus son capaces de modularla para optimizar su multiplicación (Huang, Wu et al. 2011, Mitchell and Friesen 2012, Mitchell, Byers et al. 2013). Se ha propuesto que la activación de DDR en células de insecto infectadas por baculovirus tiene como consecuencia el disparo de las respuestas de arresto traduccional y apoptosis

(Schultz and Friesen 2009, Cerio, Vandergaast et al. 2010, Vandergaast, Schultz et al. 2011), las cuales se revisarán a continuación (Figura S-4).

4.2. Arresto traduccional

En estadios tardíos de la infección de varios tipos de virus, se observa un cese en la biosíntesis de macromoléculas de su hospedador debido a la interferencia sobre la producción, maduración, o estabilización de ADN, ARN y proteínas del huésped, permitiendo el incremento de la expresión de las proteínas víricas y la dominancia vírica sobre las rutas biosintéticas del hospedador (Mathews 1996). Durante la infección con AcMNPV, se ha reportado que el material genómico del hospedador no se replica (Braunagel, Parr et al. 1998) y a nivel transcripcional, se ha observado un efecto de *apagado génico* (o *shut-off*) que concluye con un arresto traduccional. Este *apagado génico* se inicia con un declive en la cantidad del mRNA del hospedador que comienza en torno a las 12 hpi (Vlak, Smith et al. 1981, Ooi and Miller 1988, van Oers, van der Veken et al. 2001, Salem, Zhang et al. 2011, Chen, Zhong et al. 2014) y, consecuentemente, la síntesis de proteínas del hospedador decae desde las 18 hpi hasta completar su arresto a las 24 hpi (O'Reilly, Miller et al. 1994), concomitantemente a la expresión de genes víricos tardíos y muy tardíos (Thiem 2009). Es un proceso poco comprendido hoy en día, del que no se ha identificado concretamente el gen o proceso vírico responsable, por lo que aún no se ha esclarecido si es una estrategia vírica para facilitar selectivamente la síntesis de proteínas o una respuesta del hospedador para establecer un estado defensivo anti-vírico (Du and Thiem 1997, Schultz and Friesen 2009). No obstante, se ha descrito que la replicación del vADN o la expresión de proteínas tempranas que participan en ella podrían disparar esta respuesta en la célula huésped (Prihod'ko and Miller 1996, LaCount and Friesen 1997, Schultz, Wetter et al. 2009, Schultz and Friesen 2009). Mediante el silenciamiento de factores implicados en la replicación del vADN, se ha observado que se suprime tanto la respuesta apoptótica como el efecto de arresto traduccional (Schultz and Friesen 2009), habiéndose propuesto que la replicación del vADN activaría la DDR celular que dispararía las respuestas de apoptosis y arresto traduccional (Schultz and Friesen 2009, Huang, Wu et al. 2011, Mitchell and Friesen 2012), como acontece en infecciones víricas en células de mamífero (Schneider and Mohr 2003, Clemens 2005). Así, la célula huésped coordinaría ambas respuestas y el arresto traduccional podría desencadenar la activación de rutas apoptóticas a través del bloqueo en la reposición de ciertas proteínas celulares anti-apoptóticas (Cerio, Vandergaast et al. 2010, Vandergaast, Schultz et al. 2011, Vandergaast, Mitchell et al. 2015). Esta hipótesis estaría apoyada por los trabajos que demuestran que la codificación de una ARN polimerasa vírica por parte del baculovirus representaría una estrategia anticipatoria a dicha respuesta celular (O'Reilly, Miller et al. 1994, Blissard 1996, Rohrmann 2013). (Figura S-4)

4.3. Apoptosis

En general, se considera que la apoptosis supone una respuesta de defensa eficaz ante infecciones víricas, ya que la multiplicación de algunos virus se ve negativamente afectada con la caída de la viabilidad celular y el disparo de la apoptosis (Best 2008). Esta hipótesis se apoya en trabajos que muestran el disparo de la apoptosis durante la replicación de diversos virus, entre los que también se encuentran los baculovirus (Clem 2001, Clarke and Clem 2003, Clem 2007, Thiem 2009, Monteiro, Carinhas et al. 2012). En la infección por baculovirus, la apoptosis es una respuesta celular frente a la infección puesto que consigue neutralizar la multiplicación vírica (Clem, Fechheimer et al. 1991, Hershberger, Dickson et al. 1992, Cartier, Hershberger et al. 1994, Clem and Miller 1994, Hershberger, LaCount et al. 1994, Manji and Friesen 2001). Hay artículos que apoyan que la replicación del vADN sería la principal señal apoptótica (Clem and Miller 1994, Kool, Ahrens et al. 1994, Lu and Miller 1995, Clarke and Clem 2003, Schultz and Friesen 2009, Cerio, Vandergaast et al. 2010, Vandergaast, Schultz et al. 2011, Vandergaast, Mitchell et al. 2015), dado que es un proceso concomitante con la activación de caspasas (LaCount and Friesen 1997, LaCount, Hanson et al. 2000, Schultz, Wetter et al. 2009) y con la degradación de proteínas celulares anti-apoptóticas (Cerio, Vandergaast et al. 2010, Vandergaast, Schultz et al. 2011, Mitchell and Friesen 2012, Vandergaast, Mitchell et al. 2015). Otros apoyan que se dispara por medio de proteínas víricas implicadas en la replicación del vADN (Clem and Miller 1994, Prikhod'ko and Miller 1996, LaCount and Friesen 1997, Prikhod'ko and Miller 1999, Schultz, Wetter et al. 2009), de modo similar a proteínas víricas pro-apoptóticas de otros virus (Hay and Kannourakis 2002, Galluzzi, Brenner et al. 2008). Aunque, como este tipo de proteínas son de expresión muy temprana y se ha descrito que los eventos muy tempranos de la infección con baculovirus no disparan apoptosis en las células infectadas (Clem and Miller 1994, LaCount and Friesen 1997), parece más probable que su participación sea indirecta y relacionada con su posible participación en la replicación del vADN (Du and Thiem 1997, Clarke and Clem 2003, Schultz and Friesen 2009, Vandergaast, Schultz et al. 2011). Sin embargo, hay casos en los que la replicación del vADN no induce apoptosis en la célula infectada, por lo que se considera que los baculovirus son capaces de disparar la apoptosis mediante diversos mecanismos (Clem 1997, Clem 2001, Clarke and Clem 2003, Kelly, Chapple et al. 2008).

4.3.1. Cascada apoptótica en células de insecto

Durante la infección con baculovirus mutantes para las proteínas anti-apoptóticas como P35 (Clem, Fechheimer et al. 1991, Clem and Miller 1993, Crook, Clem et al. 1993, Birnbaum, Clem et al. 1994, Clem and Miller 1994) o la exposición a distintos estímulos pro-apoptóticos (Vucic, Seshagiri et al. 1997, Sah, Taneja et al. 1999, Mohan, Taneja et al. 2003, Sahdev, Taneja et al. 2003, Bryant, Zhang et al. 2009, Kumarswamy, Seth et al. 2009), las células de insecto exhiben signos característicos de apoptosis como la activación de caspasas, fragmentación del ADN y citolisis (Blissard 1996, Clem 1997). Al igual que ocurre en mamíferos, levaduras y nematodos, la amplificación de la señal apoptótica se produce mediante la activación jerarquizada de las caspasas (Dorstyn, Read et al. 2002, Muro, Monser et al. 2004,

Muro, Means et al. 2005, Courtiade, Pauchet et al. 2011, Berthelet and Dubrez 2013). En células de lepidópteros, se ha identificado una caspasa iniciadora denominada L-Caspasa X ó L-Dronc, homóloga a la caspasa iniciadora Dronc de *Drosophila* (Manji and Friesen 2001, Zoog, Schiller et al. 2002, Suganuma, Ushiyama et al. 2011, Huang, Covicristov et al. 2013, Kitaguchi, Hamajima et al. 2013). Compartiendo características con caspasas iniciadoras presentes en otros organismos, L-Dronc posee un largo pro-dominio y, en presencia de distintos estímulos pro-apoptóticos como luz UV, actinomicina D o infección por baculovirus, es procesada y activada (Suganuma, Ushiyama et al. 2011, Huang, Covicristov et al. 2013, Kitaguchi, Hamajima et al. 2013). Las caspasas L-Dronc activadas presentan afinidad por varios sustratos peptídicos típicos de caspasas iniciadoras, como Ac-IETD o Ac-LEHD, y por las caspasas efectoras (Suganuma, Ushiyama et al. 2011, Huang, Covicristov et al. 2013, Kitaguchi, Hamajima et al. 2013). En células del lepidóptero *S. frugiperda* la principal caspasa efectora descrita es *Sf*-caspasa 1, que también presenta características comunes a las presentes en otros organismos como su corto pro-dominio (Fraser and Evan 1997, Fraser, McCarthy et al. 1997, Chowdhury, Tharakan et al. 2008, Courtiade, Pauchet et al. 2011) y su activación mediante un proceso proteolítico mediado por la principal caspasa iniciadora *Sf*-Dronc (Ahmad, Srinivasula et al. 1997, LaCount, Hanson et al. 2000, Zoog, Schiller et al. 2002, Liu and Chejanovsky 2006, Huang, Covicristov et al. 2013). La actividad de *Sf*-caspasa 1 se ha relacionado con la amplificación de la apoptosis en células de *S. frugiperda*, ya que correlaciona con la aparición de fragmentación del ADN durante tratamientos con drogas pro-apoptóticas (Kim, Kramer et al. 2007) y con los rasgos morfológicos típicos de apoptosis en infecciones con mutantes defectivos para las proteínas víricas anti-apoptóticas (LaCount and Friesen 1997).

La participación de las mitocondrias en la regulación de la apoptosis está evolutivamente conservada entre animales y plantas. En células de mamífero, los cambios estructurales de las mitocondrias y la liberación de citocromo C mitocondrial son considerados señales de activación de la cascada apoptótica (Liu, Kim et al. 1996, Desagher and Martinou 2000, Abdelwahid, Rolland et al. 2011). En células vegetales, la alteración de las estructuras mitocondriales y la liberación del citocromo C también preceden a la activación de la ruta apoptótica (Balk, 1999). Sin embargo, el papel que juegan estos dos eventos en células de insectos no está tan esclarecido y existe cierta incertidumbre sobre su participación en la apoptosis, debida a la variabilidad de resultados descritos y a las dificultades técnicas para su detección (Abdelwahid, Yokokura et al. 2007). En cultivos celulares de *Drosophila*, la activación de las caspasas durante la apoptosis está regulada por proteínas citosólicas pro-apoptóticas y es independiente de la liberación citoplasmática del citocromo C mitocondriales (Means, Muro et al. 2006, Abdelwahid, Yokokura et al. 2007, Liu, Yang et al. 2012). No obstante, en lo referente a la implicación de las mitocondrias y la liberación del citocromo C durante la apoptosis en células de lepidópteros se han documentado resultados discrepantes. Gran cantidad de trabajos apoyan el papel activo de las mitocondrias mediante la liberación del citocromo C en la activación de la cascada apoptótica de células de lepidópteros en presencia de estímulos pro-apoptóticos como la luz UV, el estrés oxidativo (Mohan,

Taneja et al. 2003, Sahdev, Taneja et al. 2003, Shan, Liu et al. 2009, Chandna, Suman et al. 2013, Chen, Hu et al. 2015), drogas pro-apoptóticas (Kumarswamy, Seth et al. 2009) e infecciones con baculovirus (Liu, Peng et al. 2007, Liu, Shu et al. 2012). Apoyando esta hipótesis se encuentran trabajos que describen la activación de caspasas en extractos de células Sf9 mediante la adición de citocromo C exógeno (Kumarswamy, Seth et al. 2009, Liu, Yang et al. 2012, Liu, Shu et al. 2012) o el bloqueo de la activación de caspasas al tratar cultivos infectados por baculovirus con iARN frente a citocromo C (Liu, Shu et al. 2012). Sin embargo, hay otros artículos que cuestionan la participación de este evento en el disparo de la señal apoptótica en lepidópteros como ya sea mediante evidencia indirecta, ante la ausencia de función anti-apoptótica de proteínas conservadas como Bcl-2 (Cartier, Hershberger et al. 1994), o directas, mediante la no detección de diferencias entre la cantidad de citocromo C retenido/liberado tras la inducción de apoptosis por infección con baculovirus (Miller, Luque et al. 2002).

4.3.2. Proteínas anti-apoptóticas descritas en baculovirus

Los baculovirus codifican proteínas anti-apoptóticas que les permiten frenar la apoptosis y completar su ciclo replicativo con éxito en las células infectadas (Clem, Fechheimer et al. 1991, Birnbaum, Clem et al. 1994, Clem and Miller 1994, Clem 1997). De tal manera que las células de insecto infectadas con baculovirus no mueren por apoptosis prematura (12-24 hpi) sino por un proceso de muerte celular necrótico derivado de los estragos producidos por el CPE y el arresto traduccional (Clem, Fechheimer et al. 1991, Manji, Hozak et al. 1997, Clarke and Clem 2003, Clem 2005). Se han identificado diferentes proteínas anti-apoptóticas en los diferentes grupos de baculovirus (Clem 2005, Yu, Lin et al. 2008, Ikeda, Yamada et al. 2013), de las cuales revisaremos en detalle las proteínas P35 e IAP, ya que han sido las más estudiadas y las más relevantes para el presente trabajo de Tesis.

4.3.2.1. P35

Es una proteína de 35 kDa codificada por algunos baculovirus, como *AcMNPV* o *BmNPV* (Ikeda, Yamada et al. 2013), que frena la apoptosis en las células infectadas mediante su unión covalente a las caspasas efectoras activadas (Clem, Fechheimer et al. 1991, Alnemri, Robertson et al. 1992, Ahmad, Srinivasula et al. 1997, Zhou, Krebs et al. 1998, Kelly, King et al. 2006, Ikeda, Yamada et al. 2011). En su ausencia, la expresión de genes tardíos, la multiplicación del virus y la producción de proteínas del hospedador se ven comprometidos (Clem, Fechheimer et al. 1991, Hershberger, Dickson et al. 1992, Cartier, Hershberger et al. 1994, Clem and Miller 1994, Hershberger, LaCount et al. 1994, Manji and Friesen 2001, Ishikawa, Ikeda et al. 2003). En *AcMNPV*, la proteína *Ac-P35* está constituida por 299 aa, presenta un patrón temporal de expresión temprano y tardío (Friesen and Miller 1987, Friesen 1997, Kelly, King et al. 2007, Rohrmann 2013) y, en ensayos de expresión transitoria, se ha observado que su promotor está activado en *trans* por la proteína *Ac-IE1* (Nissen and Friesen 1989, Friesen 1997). Predominantemente, *Ac-P35* se localiza en el citoplasma de las células infectadas (Hershberger, LaCount et al. 1994) y no presenta homología de secuencia con otras proteínas anti-apoptóticas conocidas, pese a

bloquear e inhibir la apoptosis en diferentes organismos y tipos celulares (Rabizadeh, LaCount et al. 1993, Sugimoto, Friesen et al. 1994, Xue and Horvitz 1995, Zhou, Krebs et al. 1998, Lannan, Vandergaast et al. 2007, Ji and Ma 2015).

4.3.2.2. IAP

Otra estrategia anti-apoptótica desarrollada por los baculovirus es la expresión de unas proteínas denominadas IAPs víricos (vIAPs). Aunque el mecanismo molecular exacto por el que inhiben la apoptosis no está del todo dilucidado (Clarke and Clem 2003, Clem 2007), se sabe que los vIAP actúan sobre un nivel anterior en la cascada de activación de las caspasas respecto a la proteína Ac-P35 (Zoog, Schiller et al. 2002), bloqueando la acción de las caspasas iniciadoras e impidiendo la amplificación de la señal apoptótica y el consecuente procesamiento proteolítico de las caspasas efectoras (Manji, Hozak et al. 1997, Seshagiri and Miller 1997, LaCount, Hanson et al. 2000). Sin embargo, los vIAP son incapaces de frenar la apoptosis una vez han sido proteolíticamente activadas las caspasas efectoras (LaCount, Hanson et al. 2000), ni de bloquear a las caspasas iniciadoras a ningún nivel en células de *Drosophila* (Wright, Means et al. 2005). Los vIAP suelen presentar varias copias en el genoma de los baculovirus, generalmente siendo las proteínas tipo IAP3 las que presentan actividad anti-apoptótica (Crook, Clem et al. 1993, Birnbaum, Clem et al. 1994, Maguire, Harrison et al. 2000, Manji and Friesen 2001, Miller, Luque et al. 2002, Carpes, de Castro et al. 2005, Kim, Xiao et al. 2007). No obstante en algunos baculovirus los vIAPs no presenta función anti-apoptótica en cultivo celular (Maguire, Harrison et al. 2000, Ikeda, Yanagimoto et al. 2004, Yu, Lin et al. 2008, Yu 2010, Ikeda, Yamada et al. 2011, Yamada, Shibuya et al. 2012), como es el caso de los vIAPs de AcMNPV (Clem and Miller 1994, Griffiths, Barnett et al. 1999). Además, han sido identificadas proteínas IAPs homólogas en las células (cIAPs) (Clem and Duckett 1997, Deveraux, Roy et al. 1998, Berthelet and Dubrez 2013), para las que se han descrito diversas funciones como el bloqueo de la apoptosis, la supervivencia celular o la diferenciación (O'Riordan, Bauler et al. 2008, Srinivasula and Ashwell 2008). Los cIAPs identificados en lepidópteros (Seshagiri, Vucic et al. 1999, Huang, Deveraux et al. 2000, Huang, Deveraux et al. 2001, Liao, Yang et al. 2002, Cerio, Vandergaast et al. 2010) presentan una acción anti-apoptótica limitada y reversible (Manji and Friesen 2001, Ishikawa, Ikeda et al. 2003, Ikeda, Yamada et al. 2011). En *S.frugiperda*, el *Sf-IAP* es una proteína de vida media corta que se degrada rápidamente al tiempo que se replica el vADN durante la infección de baculovirus (Schultz and Friesen 2009, Cerio, Vandergaast et al. 2010, Vandergaast, Schultz et al. 2011, Vandergaast, Mitchell et al. 2015). Se cree que, debido al arresto traduccional asociado a la infección por baculovirus, existe un cese en la renovación de esta proteína que, junto con su rápida degradación, favorecería al disparo de la apoptosis durante la infección (Du and Thiem 1997, Clem 2001, Clarke and Clem 2003, Cerio, Vandergaast et al. 2010, Vandergaast, Schultz et al. 2011) (Figura S-4). En concordancia, se ha sugerido que en células de lepidópteros ocurriría una regulación de la cascada apoptótica por parte de los cIAP similar a la que ocurre en las células de *Drosophila* (Cerio, Vandergaast et al. 2010, Vandergaast, Schultz et al. 2011, Vandergaast, Mitchell et al. 2015). Éstas se hallan en un

constante estado de “alerta” produciendo la caspasa Dronc, quien continuamente está anulada por interacción con su principal cIAP (DIAP1) que induce su degradación hasta que cualquier alteración de este equilibrio permite la activación de Dronc y de la cascada apoptótica (Muro, Means et al. 2005). Este paralelismo entre células de distintos órdenes de insecto ha sido respaldada por trabajos de inducción de apoptosis mediante la ablación y la degradación de los cIAP en los respectivos cultivos celulares (Muro, Hay et al. 2002, Muro, Means et al. 2005, Bryant, Zhang et al. 2009, Wu, Wu et al. 2013).

4.4. Activación de rutas de proliferación y supervivencia celular

Al igual que otros virus (Cooray 2004, Diehl and Schaal 2013), los baculovirus también activan rutas celulares de supervivencia y proliferación, permitiéndoles cierto control sobre las vías metabólicas de su hospedador (Monteiro, Carinhas et al. 2012). Concretamente para *AcMNPV*, se ha descrito que activa la ruta de supervivencia regulada por las proteínas PI3K/Akt en células Sf21 (Xiao, Yang et al. 2009) a tiempos muy tempranos de la infección (2-6 hpi) y, si es inhibida a tiempos de 12 hpi, interfiere con la correcta replicación del vADN y expresión de genes tardíos, afectando a la producción de BV y OB. A nivel celular, la ruta regulada por PI3K/Akt controla diversos procesos celulares como supervivencia celular o apoptosis, proliferación, migración o regulación del metabolismo (Song, Ouyang et al. 2005).

5. Sistema de expresión de proteínas heterólogas basado en vectores baculovirus

Desde sus inicios en los años 80 (Smith, Summers et al. 1983, Pennock, Shoemaker et al. 1984), la tecnología de producción de proteínas recombinantes mediante el uso de vectores baculovirus modificados (*BEVS*) ha sido una plataforma muy relevante, universalmente reconocida como una herramienta robusta y versátil para la expresión de proteínas heterólogas (Summers 2006, van Oers 2011, Felberbaum 2015, van Oers, Pijlman et al. 2015). Este sistema se compone de dos elementos: el vector baculovirus, que incorpora la secuencia génica recombinante de interés en su genoma, y el hospedador, donde se expresa el producto recombinante. De manera general, los vectores baculovirus recombinantes poseen el genoma del virus *AcMNPV* (van Oers 2006) y se generan por recombinación homóloga (Smith, Summers et al. 1983, Pennock, Shoemaker et al. 1984, Vlak, Schouten et al. 1990, Weyer and Possee 1991, Hitchman, Locanto et al. 2011) o por transposición (Luckow, Lee et al. 1993, Invitrogen 2010). Este último método supone un procedimiento rápido y sencillo que lo ha popularizado (Hunt 2005, Kost, Condreay et al. 2005, van Oers 2006, Hitchman, Possee et al. 2009, van Oers, Pijlman et al. 2015).

En lo referente al hospedador, existen diferentes líneas celulares de insecto que difieren sutilmente en sus ratios de crecimiento, de productividad y secreción de proteínas así como en el patrón de glicosilación sobre la proteína heteróloga (Kulakosky, Shuler et al. 1998, Harrison and Jarvis 2006, van Oers 2006, Palomares, Realpe et al. 2015), pero que comparten su independencia del exhaustivo control del CO₂ o su sencilla adaptabilidad a los medios de cultivo sin suero respecto a las células de mamífero (Ikonomou, Schneider et al. 2003, van Oers 2006, Buckland, Boulanger et al. 2014). Como líneas

celulares permisivas a la infección con el baculovirus AcMPNV destacan las derivadas de los lepidópteros *S. frugiperda*, Sf21 (IPLB-SF21-AE) y su aislado clonal Sf9 (IPLB-SF9), o *T. ni*, Tn-5BTI-TN5B1-4 (Wickham, Davis et al. 1992, Wickham and Nemerow 1993). Las líneas celulares de insecto son capaces de crecer en diferentes condiciones de cultivo y son relativamente fácilmente escalables adaptando su crecimiento en bio-reactores (Vicente, Roldao et al. 2011, Buckland, Boulanger et al. 2014), por lo que se han utilizado indistintamente para la producción de los diferentes productos recombinantes presentes en el mercado farmacéutico (Tabla S-2) (Figura S-5.A) (Contreras-Gómez, Sanchez-Mirón et al. 2014, Felberbaum 2015, Palomares, Realpe et al. 2015, van Oers, Pijlman et al. 2015). También se ha explotado en paralelo el potencial de sus hospedadores naturales, las larvas de noctuido, como biofactorías, tanto por su elevada productividad como por su reducido coste (Figura S-5.B) (Maeda 1989, Barderas, Wigdorovitz et al. 2000, Liu, DeCarolís et al. 2007, Kato, Kajikawa et al. 2010, Gomez-Casado, Gomez-Sebastian et al. 2011, Dudognon, Romero-Santacreu et al. 2014).

5.1. Ventajas del uso del sistema BEVS en la expresión de proteínas recombinantes

Este sistema de expresión de proteínas heterólogas representa un ambiente productivo eucariótico y comparte la maquinaria de procesamiento y las rutas de secreción con las células de mamíferos, hecho de suma importancia en la obtención de productos biológicamente activos mediante la expresión de genes eucarióticos heterólogos (Hu 2005, Fath-Goodin, Kroemer et al. 2006, Summers 2006, van Oers 2011, Contreras-Gómez, Sanchez-Mirón et al. 2014, van Oers, Pijlman et al. 2015). De esta manera, la proteína heteróloga se expresa en un entorno favorable para la adquisición de su correcto plegamiento y las pertinentes modificaciones post-traduccionales (O'Reilly, Miller et al. 1994, Fath-Goodin, Kroemer et al. 2006, Hitchman, Possee et al. 2009, Palomares, Realpe et al. 2015, van Oers, Pijlman et al. 2015). Además, esta tecnología se distingue por el elevado potencial de expresión de la proteína heteróloga, debido a que su expresión suele estar regulada por promotores de actividad muy fuertes como los que regulan la expresión de los genes dispensables para la replicación vírica *polh* o *p10* (Smith, Summers et al. 1983, Vlak, Klinkenberg et al. 1988, Vlak, Schouten et al. 1990, O'Reilly, Miller et al. 1994).

El vector baculovirus es capaz de admitir insertos génicos de gran tamaño debido a la flexibilidad de sus nucleocápsides (O'Reilly, Miller et al. 1994, Hu 2005, Fath-Goodin, Kroemer et al. 2006, Rohrmann 2013, Felberbaum 2015, van Oers, Pijlman et al. 2015), llegando a expresar simultáneamente varias proteínas heterólogas (Weyer and Possee 1991, Summers 2006, Hitchman, Possee et al. 2009, van Oers, Pijlman et al. 2015). Además, destacan su sencillez y rapidez, gracias a la manipulación directa del baculovirus a través de plásmidos recombinantes que contienen la secuencia génica de interés (Luckow, Lee et al. 1993, O'Reilly, Miller et al. 1994, Fath-Goodin, Kroemer et al. 2006, Summers 2006, Rohrmann 2013, Contreras-Gómez, Sanchez-Mirón et al. 2014, Felberbaum 2015, van Oers, Pijlman et al. 2015). También permiten incluir optimizaciones en las secuencias génicas recombinantes para favorecer la producción (Hulst, Westra et al. 1993, van Oers 2006), la estabilidad (Margine, Palese et al. 2013, Holtz,

Robinson et al. 2014) o el potencial antigénico (Cheever and Higano 2011, Gil, Pérez-Filgueira et al. 2011, Terron-Exposito, Dudognon et al. 2012) de las proteínas de interés expresadas.

Por otro lado, cabe resaltar la seguridad de este sistema inherente al estrecho rango de hospedador de los baculovirus (Carbonell and Miller 1987, O'Reilly, Miller et al. 1994, Hu 2005, Kost, Condreay et al. 2005, van Oers 2006, van Oers 2011, Ferrelli, Berretta et al. 2012, Felberbaum 2015). Esta característica favorece tanto la aprobación de productos sanitarios y veterinarios generados con esta plataforma (van Oers 2006, van Oers 2011, Felberbaum 2015, Palomares, Realpe et al. 2015), como la reducción de los costes asociados (Josefsberg and Buckland 2012, Contreras-Gómez, Sanchez-Mirón et al. 2014, Felberbaum 2015). Adicionalmente a su versatilidad y eficiencia, esta tecnología posibilita el empleo de metodologías de purificación del producto ya implantadas para otros sistemas productivos (Hopkins, Esposito et al. 2010, Contreras-Gómez, Sanchez-Mirón et al. 2014, Felberbaum 2015).

5.2. Limitaciones del sistema BEVS

Pese a que las características distintivas del sistema BEVS hacen que sea una elección atractiva para la expresión de proteínas recombinantes, también presenta algunas limitaciones al igual que el resto de tecnologías de producción de proteínas heterólogas. El principal cuello de botella es la naturaleza lítica del sistema como resultado de la replicación del baculovirus en la célula huésped (Apartado 4, Introducción), de manera que el entorno intracelular lítico coincide con el tiempo óptimo de actividad de los promotores del baculovirus empleados para la expresión de la proteína heteróloga de interés, pudiendo afectar a su integridad y provocar su degradación tanto en cultivo celular como en larvas de lepidóptero (Pyle, Barton et al. 1995, Cha, Pham et al. 1997, Grosch and Hasilik 1998, Naggie and Bentley 1998, Pham, Naggie et al. 1999, Ikonomou, Schneider et al. 2003, Brondyk 2009, Kato, Kajikawa et al. 2010, Usami, Ishiyama et al. 2010, van Oers 2011, Contreras-Gómez, Sanchez-Mirón et al. 2014). También se alterane la maquinaria de expresión, la ruta secretora y la maquinaria post-traducciona de las células infectadas (Kulakosky, Hughes et al. 1998, van Oers, van der Veken et al. 2001, Yun, Goo et al. 2005, Harrison and Jarvis 2006, Carinhas, Robitaille et al. 2011, Salem, Zhang et al. 2011, Monteiro, Carinhas et al. 2012, Nguyen, Nielsen et al. 2013), lo que perjudica el plegamiento y la secreción de ciertas glicoproteínas y proteínas transmembrana producidas (Jarvis and Summers 1989, Vernet, Tessier et al. 1990, Wickham, Davis et al. 1992, Jarvis, Summers et al. 1993, Tremblay, Kennedy et al. 1993, Kulakosky, Hughes et al. 1998, Ailor and Betenbaugh 1999, van Oers, Thomas et al. 2001, Higgins, Demir et al. 2003, Yun, Goo et al. 2005, Fath-Goodin, Kroemer et al. 2006, Salem, Zhang et al. 2011). De tal manera que el estado de viabilidad del hospedador determina el tiempo de recogida de ciertos productos recombinantes (Cha, Pham et al. 1997, Palomares, Estrada-Mondaca et al. 2004, Fath-Goodin, Kroemer et al. 2006, Murhammer 2007, Vicente, Roldao et al. 2011, Kollewe and Vilcinskis 2013).

5.3. Mejoras desarrolladas en el sistema BEVS

Existen artículos centrados en las mejoras del sistema BEVS en lo que refiere al hospedador, focalizados en la mejora de la expresión de glicoproteínas y proteínas secretables mediante el desarrollo de cultivos celulares estables más resistentes al efecto lítico del baculovirus (Li, Brown et al. 2001, Fath-Goodin, Kroemer et al. 2006, Kim, Kramer et al. 2007, Lai, Hsu et al. 2012, Kollewe and Vilcinskis 2013), o en su modificación para la expresión de enzimas de mamífero recombinantes que consiguen asemejar la glicosilación de las proteínas heterólogas a la producida en ese tipo celular (Kost, Condreay et al. 2005, Fath-Goodin, Kroemer et al. 2006, Harrison and Jarvis 2006, Shi and Jarvis 2007, van Oers 2011, van Oers, Pijlman et al. 2015). También hay trabajos dirigidos a la mejora de los medios de cultivo (Ikonomou, Schneider et al. 2003, Vieira, Pereira et al. 2010, Contreras-Gómez, Sanchez-Mirón et al. 2014), o la mejora en la inoculación de larvas (Chen, Shen et al. 2009, Xiang, Yang et al. 2010, Lee, Sohn et al. 2012, Ardisson-Araujo, Rocha et al. 2013, Sampieri, Luz-Madrigal et al. 2015). Respecto a los vectores, los avances se han centrado tanto en el incremento de la producción de la proteína recombinante (Sano, Maeda et al. 2002, Chen, Yao et al. 2004, Venkaiah, Viswanathan et al. 2004, Ishiyama and Ikeda 2010, Lin, Chen et al. 2010), como de la calidad de la misma. En 2ª esta línea, los vectores baculovirus han sido modificados para incluir promotores víricos de actividad temprana que permiten la expresión de la proteína heteróloga en ausencia del ambiente proteolítico pero en menor cantidad (Crawford and Miller 1988, Bozon, Remy et al. 1995, Chazenbalk and Rapoport 1995, Jarvis, Weinkauff et al. 1996, Chen, Yao et al. 2004, Regev, Rivkin et al. 2006, Gao, Wang et al. 2007, van Oers 2011). También, se han generado vectores baculovirus mejorados que co-expresan la proteína de interés con enzimas recombinantes de la ruta de glicosilación en mamíferos (Palmberger, Wilson et al. 2012, Mabashi-Asazuma, Kuo et al. 2014) o con proteínas implicadas en las rutas de expresión y plegamiento que permiten su correcta producción (Tate, Whiteley et al. 1999, Higgins, Demir et al. 2003, Teng, Chang et al. 2013). Además, considerando la relación entre el aumento de la producción de la proteína heteróloga y el mantenimiento de la viabilidad del cultivo celular infectado (Rhee, Kim et al. 1999, Kim, Kramer et al. 2007, Teng, Chang et al. 2013), se han desarrollado vectores que retardan la aparición del proceso lítico y la subsecuente muerte celular, preservando así la maquinaria celular y mejorando con ello la calidad de la proteína heteróloga expresada (Lee, Chen et al. 1998, Ho, Lo et al. 2004, Kaba, Salcedo et al. 2004, Fath-Goodin, Kroemer et al. 2006, Hitchman, Possee et al. 2010). Cabe destacar el reciente desarrollo en nuestro laboratorio del vector mejorado con el casete TB, el cual supone una mejora del vector baculovirus al incrementar los niveles productivos de las proteínas heterólogas con el mantenimiento de una integridad y viabilidad celulares prolongadas durante el transcurso de la infección, permitiendo la adquisición del correcto plegamiento, la menor degradación y un aumento en la expresión de la proteína recombinante de hasta 4 veces respecto a un vector baculovirus convencional (Gómez-Sebastián, López-Vidal et al. 2014, Lopez-Vidal 2014, López-Vidal, Gómez-Sebastián et al. 2015) (Figura 4). Este vector porta un casete de expresión que se compone de un cADN codificante para los factores transactivadores del propio baculovirus, IE0 e IE1,

expresados bajo el control del promotor *polh*, y la región *hr1* que potencia la actividad de los promotores químericos combinados con el promotor *p10* a los que va asociada, los cuales regulan la expresión de la proteína heteróloga de interés.

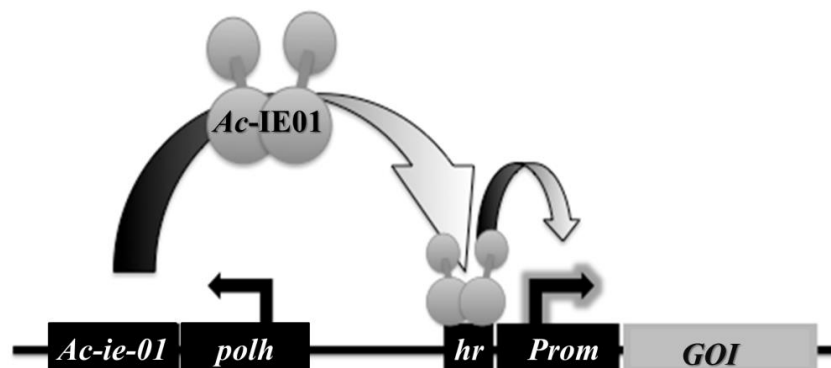


Figura 4: Esquema de los elementos reguladores presentes en los vectores baculovirus modificados con el casete de expresión TB (Gómez-Sebastián, López-Vidal et al. 2014). La mejora implementada por la adición del casete TB consiste en el resultado de la combinación de secuencias promotoras químeras que han de contener la secuencia promotora *p10* (a continuación del promotor elegido, *Prom*) y a las que se añade la región *hr1* (situada en la región 5' promotor químérico, *hr*) encargadas de regular la expresión de la secuencia codificante de interés (*GOI*), junto con la copia adicional del cADN codificante (*Ac-ie-01*) para los factores reguladores en *trans* de las secuencias *hr* del baculovirus *Ac-IE0* e *IE1* controlada por el promotor vírico de actividad a tiempos muy tardíos *polh*.

Otra estrategia relacionada con la mejora del sistema a nivel del vector supone la incorporación de péptidos señal que eviten la degradación de la proteína recombinante mediante la mejora y el fomento del tráfico proteico (Garnier, Cahoreau et al. 1995). La maquinaria de procesamiento proteico de las células de insecto hospedadoras es capaz de reconocer diferentes péptidos señal heterólogos (Maeda 1989, Jarvis, Summers et al. 1993, Ailor, Pathmanathan et al. 1999, Stepanyuk, Xu et al. 2008, Futatsumori-Sugai and Tsumoto 2010), que facilitan la purificación de la proteína recombinante de interés fomentando su secreción (Wickham and Nemerow 1993, Sisk, Bradley et al. 1994, Palomares, Estrada-Mondaca et al. 2004, van Oers 2006). A su vez, minimizan la posible degradación de las proteínas expresadas por actuación de las proteasas intracelulares y permiten la adición de modificaciones post-traduccionales (Walker 2010). Entre otros, destaca el uso del péptido señal de la proteína melitina expresada por las abejas (*A. mellifera*, (Zimmermann and Mollay 1986)), con el que se han descrito mejoras sustanciales en la producción de proteínas recombinantes empleando el sistema BEVS (Tessier, Thomas et al. 1991, Sisk, Bradley et al. 1994, Bozon, Remy et al. 1995, Kaba, Salcedo et al. 2004, Gomez-Sebastian, Perez-Filgueira et al. 2008, Gómez-Sebastián, Nunez et al. 2012, Dudognon, Romero-Santacreu et al. 2014, Pecora, Malacari et al. 2015). También es reseñable la utilización de la señal tetrapéptica de retención en retículo KDEL (Munro and Pelham 1987), que ha demostrado efectos beneficiosos en la mejora de la solubilidad, la adquisición de modificaciones post-traduccionales y plegamiento adecuados, y en la protección frente a la degradación durante la expresión de proteínas recombinantes en plantas (Petrucelli, Otegui et al. 2006), células de mamífero (Zagouras and Rose 1989, Yoshimori, Semba et al. 1990, Biocca,

Tafani et al. 1998) y en el sistema BEVS (Okamoto, Minamikawa et al. 1999, Wu, Gousset et al. 2007, Gomez-Casado, Gomez-Sebastian et al. 2011, Dudognon, Romero-Santacreu et al. 2014).

5.4. Aplicaciones biotecnológicas de los baculovirus

Las primeras aplicaciones biotecnológicas de los baculovirus estuvieron relacionadas con el control de plagas, no sólo por su estrecho rango de hospedador sino también por los problemas derivados del uso de pesticidas químicos (Summers 2006, Bonning and Nusawardani 2007, Rohrmann 2013). Así, el desarrollo de la tecnología BEVS en este campo supuso mejoras en el incremento de la virulencia y patogenicidad de las cepas recombinantes mediante la adición de determinados genes heterólogos (Maeda 1989, Regev, Rivkin et al. 2006, Summers 2006, Bonning and Nusawardani 2007, Kroemer, Bonning et al. 2015). No obstante, las ventajas que presenta esta tecnología han hecho que su uso se haya expandido en los últimos años, tanto en el ámbito académico (Roy and Noad 2012, Bill and von der Haar 2015), como en la industria farmacéutica, donde resalta su aplicación en la producción de vacunas (Palomares, Estrada-Mondaca et al. 2004, Summers 2006, van Oers 2011, Felberbaum 2015, Palomares, Realpe et al. 2015, van Oers, Pijlman et al. 2015). De entre los productos generados con el sistema BEVS aprobados para uso humano y animal (Tabla S-2), destacaremos la vacuna frente al virus de influenza estacional basada la inmunización con glicoproteínas HA recombinantes (Flublok®, (Cox and Anderson 2006, Treanor, Schiff et al. 2006, Wang, Holtz et al. 2006, Treanor, Schiff et al. 2007, Cox and Hashimoto 2011, Treanor, Sahly et al. 2011). El agente etiológico de la gripe o influenza, perteneciente a la familia vírica *Orthomyxoviridae* (Alcamí, Alcamí et al. 2006), provoca entre 3 y 5 millones de casos de infección anuales así como entre 250000 y 500000 muertes (OMS, An, Rininger et al. 2013), especialmente incisiva en la población anciana e infantil. Hoy en día, la vacunación convencional sigue siendo la primera estrategia de combate frente a la infección por el virus de influenza (Milian and Kamen 2015), la cual se produce mediante un laborioso proceso llevado a cabo en huevos embrionados. Sin embargo, el uso de la tecnología BEVS para la producción de una vacuna frente a influenza supone una clara disrupción por la disminución del tiempo de fabricación y disponibilidad de la vacuna (Cox and Hashimoto 2011, Buckland, Boulanger et al. 2014, Milian and Kamen 2015), la seguridad añadida ante la ausencia de manejo de organismos patógenos o proteínas alergénicas (Buckland, Boulanger et al. 2014, Felberbaum 2015, Milian and Kamen 2015), la reducción del riesgo de infectividad de la vacuna inherentes al sistema convencional (Treanor, Schiff et al. 2006, Skowronski, Janjua et al. 2014, Felberbaum 2015), o la capacidad para abastecer el mercado en caso de una situación pandémica, como la ocurrida en 2009 (Wang, Holtz et al. 2006, Cox and Hashimoto 2011, Felberbaum 2015).

Por otro lado, cabe destacar la exitosa trayectoria de este sistema de expresión de proteína recombinante en la producción de VLPs (Noad and Roy 2003, Roldao, Mellado et al. 2010, Vicente, Roldao et al. 2011, Cox 2012, Liu, Wu et al. 2013, Liu, Wu et al. 2013), reflejada en el creciente nº de productos médicos y veterinarios ya aprobados (Tabla S-2). Las VLPs inducen una respuesta inmune celular y humoral semejante al virus parental del que proceden (Beyer, Herrmann et al. 2001, Barcena and

Blanco 2013, Liu, Wu et al. 2013, Liu, Zhang et al. 2013, Wang and Roden 2013), convirtiendo a las proteínas capaces de auto-ensamblarse en VLPs en candidatas para el desarrollo de vacunas subunidad(Pumpens and Grens 2001). Su utilización es especialmente relevante en patologías víricas para las que no se dispone de un modelo *in vitro* para la producción de la vacuna como es el caso de la enfermedad hemorrágica del conejo(Figura S-6). Esta enfermedad mortífera supone una amenaza tanto para el conejo salvaje como para los productos derivados del conejo doméstico (Abrantes, van der Loo et al. 2012) y está provocada por la infección con RHDV (Crisci, Almanza et al. 2009, Barcena and Blanco 2013), prototipo del género *Lagovirus* de la familia de *Caliciviridae* (Ohlinger, Haas et al. 1990, Parra and Prieto 1990). Además, las vacunas actuales no protegen frente a la nueva variante de RHDV descrita en 2010 (RHDVb), gradualmente remplaza a la cepa previa (RHDV genogrupo 1) (Le Gall-Recule, Lavazza et al. 2013, Dalton, Nicieza et al. 2014, Dalton, Abrantes et al. 2015). Por todo ello, las características del sistema BEVS posibilitan la producción de vacunas subunidad basadas en la inmunización con VLPs del virus de RHDV auto-ensambladas mediante la expresión de su principal proteína estructural, VP60 (Barcena, Verdaguer et al. 2004), quedando reflejada su eficacia inmunológica en diversos trabajos (Marin, Martin Alonso et al. 1995, Boga, Martin Alonso et al. 1997, Pérez-Filgueira, Resino-Talaván et al. 2007, Abrantes, van der Loo et al. 2012).

Objetivos

Objetivos

1. Caracterización de los efectos de la sobre-expresión de los factores transactivadores *Ac-IE0* e *IE1* sobre la viabilidad y proliferación celulares en células de insecto infectadas con vectores TB. Influencia de la citada sobre-expresión en la replicación del vector.
2. Estudio de las bases moleculares que median el mantenimiento de la viabilidad celular y la proliferación celular observados en infecciones por baculovirus modificados por el casete TB en comparación con vectores convencionales. Bases de la inhibición de la apoptosis inducida por el baculovirus y de la activación de rutas de proliferación y supervivencia celulares.
3. Papel de los diferentes elementos transactivadores del casete TB en las funciones de proliferación celular y supervivencia celular a la infección. Comprobación de su efecto sobre la producción de proteínas modelo.
4. Validación del vector TB como vector mejorado para la producción de proteínas de interés en la composición de vacunas, tanto de naturaleza glicoproteica como formadora de estructuras complejas tipo VLP.

Materiales y Métodos

1. Ácidos nucleicos

1.1. ADN

Para la obtención de los baculovirus recombinantes generados en esta tesis se empleó el sistema Bac-to-Bac® (Invitrogen, EE.UU.). Éste se basa en la transposición sitio-específica de un casete de expresión desde un vector donador a un vector receptor, denominado bácmido, que posee la capacidad de replicar en *E. coli* (Luckow, Lee et al. 1993). El gen de interés se clona en un casete de expresión del vector donador, donde es regulado por un promotor específico de baculovirus y la señal de poliadenilación del gen de la timidina quinasa del virus Herpes Simple (HSV) o la de SV40. Además este casete está flanqueado por elementos de transposición miniTn7, que permiten su transposición al vector receptor junto con un gen de resistencia a gentamicina.

1.1.1. Extracción de ADN plasmídico

La extracción del ADN plasmídico se realizó con el kit comercial “NucleoSpin® Plasmid II” (Macherey-Nagel, Alemania), siguiendo las especificaciones de la casa comercial las cuales se basan en la modificación del protocolo que describe el método de lisis alcalina de Birnboim y Doly (Birnboim and Doly 1979).

1.1.2. Extracción de ADN artificial de gran peso molecular (bácmido)

La extracción del ADN de bácmido se hizo igualmente a través de la modificación del método de lisis alcalina (Birnboim and Doly 1979), pero en esta ocasión no se usaron columnas, sino que se siguió el protocolo descrito por el manual Bac-to-Bac® (Invitrogen, versión 2013, pg 30-31).

1.1.3. Vectores empleados en esta tesis

Se han empleado como vectores donadores el plásmido pFastBac™1 (Invitrogen), que utiliza el promotor de la proteína Polihedrina (promotor *polh*) de AcMNPV para la expresión del gen de interés en un vector baculovirus convencional (generando el baculovirus recombinante vector Convencional a partir de ahora, nombrado como vector Convencional), y el plásmido mejorado mediante la incorporación del casete TB (generando el baculovirus recombinante mejorado a partir de ahora nombrado como vector TB) (Algenex S.L., España), en el que el gen interés está regulado por un promotor quimérico combinado con elementos reguladores en *cis* y en *trans* del genoma del propio baculovirus (Gómez-Sebastián, López-Vidal et al. 2014). Ambos vectores poseen los genes de resistencia a ampicilina y gentamicina y han servido de punto de partida para generar los plásmidos recombinantes desarrollados en esta tesis (Tabla 1). Cuando fue necesario, la síntesis de genes y plásmidos fue llevada a cabo por GeneScript Inc (EE.UU.).

Nombre	Vector	Utilidad	Clonaje
TB HA¹⁸⁻⁵⁹³HK	TB (Algenex S.L.)	Expresión del dominio globular o ectodominio de la proteína hemaglutinina del virus influenza A/PR/8/34 H1N1 adaptado a ratón (HA18-529), en combinación con una cola de histidinas (6xHis) y la secuencia de retención en retículo KDEL, ambas adicionadas a la región carboxilo terminal de la proteína.	La secuencia HA18-529, junto con 6xHis en su extremo carboxilo, se obtiene de un plásmido previamente generado en el laboratorio por digestión con BamHI/HindIII. El plásmido TB es digerido con XhoI/NcoI. Tras ello, se enroman tanto el vector como la secuencia, y ligan. El vector Convencional correspondiente fue generado previamente en el laboratorio (Gomez-Casado, Gomez-Sebastian et al. 2011) a partir del vector pFastBac TM 1.
TB MelHA¹⁸⁻⁵²³H	TB (Algenex S.L.)	Expresión de la proteína HA ¹⁸⁻⁵²⁹ , en combinación con el péptido señal de la proteína melitina (PS-Mel), adicionado en el extremo amino-terminal, y una cola de histidinas (6xHis), localizada en la región carboxi-terminal de la proteína.	Se amplifica la secuencia HA ¹⁸⁻⁵²⁹ por la técnica de PCR, utilizando como molde un plásmido previamente generado en el laboratorio y los cebadores <i>5Mel_Sal</i> y <i>HisTAANco Rev</i> , con los que le adiciona la diana <i>SalI</i> y el PS-Mel y en su extremo amino y una cola de histidinas y la diana <i>NcoI</i> en el carboxilo. Se digiere el producto de PCR con <i>SalI</i> y <i>NcoI</i> y se inserta en el plásmido TB digerido con <i>XhoI</i> y <i>NcoI</i> . El plásmido Convencional correspondiente fue generado previamente en el laboratorio (Gomez-Casado, Gomez-Sebastian et al. 2011) a partir del vector pFastBac TM 1.
polh Ac-ie-01	pFastBac TM 1 (Invitrogen)	Sobre-expresión de los factores trans-activadores tempranos IE0 e IE1 del virus AcMNPV, regulada bajo el promotor <i>polh</i> .	Generado previamente en el laboratorio (Lopez-Vidal 2014), Sintetizando la secuencia <i>Ac-ie-01</i> flanqueada por las dianas <i>BglII</i> y <i>SpeI</i> e insertándola se insertó en los lugares <i>BamHI</i> y <i>XbaI</i> del plásmido pFastBac TM 1.
polh Ac-ie-0Δ1	pFastBac TM 1 (Invitrogen)	Sobre-expresión del factor trans-activador temprano <i>Ac-IE0</i> del virus AcMNPV, regulada bajo el promotor <i>polh</i> . (Huijskens, Li et al. 2004, Stewart, Huijskens et al. 2005, Sokal, Nie et al. 2014).	Se sintetizó la secuencia <i>Ac-ie-0Δ1</i> (GeneScript Inc), con las dianas <i>NotI</i> en su extremo 5' y <i>PvuII</i> y <i>XbaI</i> en 3', y se digirió con las enzimas <i>NotI</i> y <i>XbaI</i> para insertarlo en el plásmido pFastBac TM 1, previamente digerido con las mismas enzimas de restricción.

(Tabla 1: continuación)

Nombre	Vector	Utilidad	Clonaje
polh <i>Ac-ie-1</i>	pFastBac TM 1 (Invitrogen)	Sobre-expresión del factor trans-activador temprano <i>Ac-IE1</i> del virus AcMNPV cepa C6, regulada bajo el promotor <i>polh</i> . (Huijskens, Li et al. 2004, Stewart, Huijskens et al. 2005, Sokal, Nie et al. 2014).	Utilizando como molde el plásmido TB, se amplifica por PCR la secuencia <i>Ac-ie-1</i> empleando los cebadores <i>pNotI IE1 Fwd</i> y <i>pPvuII XbaI IE1 Rev</i> . Seguidamente se digiere con <i>NotI</i> y <i>XbaI</i> para insertarla en el plásmido TB digerido con las mismas enzimas.
polh GFP	pFastBac TM 1 (Invitrogen)	Expresión de la proteína GFP bajo el promotor <i>polh</i> .	Generado previamente en el laboratorio (Gómez-Sebastián, López-Vidal et al. 2014, Lopez-Vidal 2014).
TB GFP	TB (Algenex S.L.)	Expresión de la proteína GFP utilizando el vector de alta expresión TB (Gómez-Sebastián, López-Vidal et al. 2014).	Generado previamente en el laboratorio (Gómez-Sebastián, López-Vidal et al. 2014, Lopez-Vidal 2014).
hr1p6.9p10GFP/polh <i>Ac-ie-0Δ1</i>	TB-B (Algenex S.L.)	Sobre-expresión del factor trans-activador temprano IE0 del virus AcMNPV, regulada bajo el promotor <i>polh</i> , en contexto del vector de alta expresión TB (Gómez-Sebastián, López-Vidal et al. 2014).	Se digirió la secuencia <i>Ac-ie-0Δ1</i> (sintetizada por GeneScript Inc incluyendo las dianas <i>NotI</i> en su extremo 5' y <i>PvuII</i> y <i>XbaI</i> en 3'), con las enzimas <i>NotI/PvuII</i> , para ser insertado en el plásmido TB también digerido con las mismas enzimas.
hr1p6.9p10GFP/polh <i>Ac-ie-1</i>	TB-C (Algenex S.L.)	Sobre-expresión del factor trans-activador temprano IE1 del virus AcMNPV, regulada bajo el promotor <i>polh</i> en contexto del vector de alta expresión TB (Gómez-Sebastián, López-Vidal et al. 2014).	Se digirió el plásmido <i>polh Ac-ie-1</i> con las enzimas <i>NotI/PvuII</i> y se insertó la secuencia <i>Ac-ie-1</i> en el plásmido TB digerido con las mismas enzimas.
polh VP60	pFastBac TM 1 (Invitrogen)	Expresión de la proteína de VP60 (VP1+VP2) del virus RHDV (genogrupo 1, GenBank Z49271) en el vector pFastBac TM 1 (López-Vidal, Gómez-Sebastián et al. 2015)	Se digiere el vector pPh306GS (Crisci, Almanza et al. 2009) con las dianas <i>BamHI</i> y <i>KpnI</i> , obteniendo la secuencia de VP60. El vector pFastBac TM 1 es digerido con las mismas enzimas de restricción y se inserta la secuencia de VP60.
TB VP60	TB (Algenex S.L.)	Expresión de la proteína de VP60 (VP1+VP2) del virus RHDV (genogrupo 1, GenBank Z49271) en el vector TB (López-Vidal, Gómez-Sebastián et al. 2015)	Se amplifica por PCR la secuencia de VP60, utilizando como molde el vector pPh306GS (Crisci, Almanza et al. 2009) e insertando las dianas de restricción <i>XhoI/XbaI</i> con cebadores <i>VP60 VP2 Xho Fw</i> y <i>VP60 VP2 Xba Rev</i> . Se inserta en el vector TB digerido con las mismas enzimas de restricción.

(Tabla 1: continuación)

Nombre	Vector	Utilidad	Clonaje
BacNi	pFastBac™1 (Invitrogen)	Control de la expresión de proteínas durante la infección de baculovirus	pFastBac™1 sin insertos adicionales.

Tabla 1: Listado de construcciones utilizadas en esta tesis

1.2. ARN

La extracción del contenido de ARN citosólico total de las muestras infectadas fue realizada según el kit comercial “ReliaPrep™ RNA Cell Miniprep System” (Promega, EE.UU.), siguiendo las indicaciones del fabricante y en una zona descontaminada y habilitada para el trabajo con este tipo de ácido nucleico.

1.3. Cuantificación de ácidos nucleicos

El ADN y el ARN se cuantificaron por espectrofotometría utilizando un equipo NanoDrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, EE.UU.). Para determinar la concentración de ADN las muestras se midieron a una absorbancia de 260 nm y su pureza se determinó estableciendo la relación de absorbancia 260/280, considerando óptimos los valores comprendidos entre 1,8 y 2,0. Para determinar la concentración de ARN las muestras se midieron a una absorbancia de 230 nm y su pureza se determinó estableciendo las relaciones de absorbancia 230/260 y 260/280, considerando óptimos los valores comprendidos entre 1,8 y 2,0.

1.4. Reacciones enzimáticas

1.4.1. Digestiones enzimáticas

Las digestiones de ADN por endonucleasas de restricción se llevaron a cabo utilizando enzimas provistas por New England Biolabs (Reino Unido), y Takara Bio Inc. (Japón), siguiendo las recomendaciones de uso (tampón y temperatura) proporcionadas por las casas comerciales.

1.4.2. Reacción de enromado

Para la reacción de enromado de los extremos protuberantes en aquellos clonajes en los que las dianas de restricción eran incompatibles, tanto el vector como el inserto de ADN a clonar fueron tratados por la enzima T4 ADN ligasa incluida en el kit “DNA Blunting Kit” (Takara Bio Inc). Gracias a las actividades 3’-5’ exonucleasa y 5’-3’ polimerasa que presenta esta enzima, los extremos protuberantes fueron transformados en extremos romos. Las reacciones de enromado llevadas a cabo durante esta tesis se hicieron a partir de 0,1 pmoles de muestra, siguiendo las indicaciones de la casa comercial.

1.5. Electroforesis

La separación electroforética de muestras de ácidos nucleicos se realizó en geles de agarosa al 1% a voltaje constante (~70 V), empleando tampón TAE 1x (Tabla 2). Para poder visualizar las bandas de los ácidos nucleicos se añadió el colorante SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen) a la agarosa. Las muestras se prepararon con tampón de carga 6x (Tabla 2) y se emplearon los marcadores de peso

molecular de 1 kb (1 kb DNA Ladder, Nippon Genetics, Japón) y 100 pb (100 pb DNA Ladder, Biotools B & M Labs, España). Los geles fueron visualizados y fotografiados utilizando el equipo ChemiDoc™ XRS+ imaging systems (Bio Rad Laboratories, EE.UU.).

Nombre	Composición
Tampón RIPA completo	NaCl 150 mM, NP-40 1%, SDS 0,1%, 50 mM Tris-HCl 1M pH 8.0, β-mercaptoetanol 5mM, Complete® 1x
Tampón para extracción HA	PBS 1x, Tritón X-100 0,01%, la mezcla de inhibidores de proteasas Complete® (Roche) y 25 mM DTT
TAE (1x)	40 mM Tris-HCl, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA, pH 8
Tampón de carga de DNA (6x)	0,25% (p/v) azul de bromofenol, 30% (v/v) glicerol
Tampón I (generación de bacterias competentes)	30 mM CH ₃ CO ₂ K; 100 mM RbCl; 10 mM CaCl ₂ ; 15% (v/v) glicerol
Tampón II (generación de bacterias competentes)	10 mM NaMOPS; 10 mM RbCl; 75 mM CaCl ₂ ; 15% (v/v) Glicerol
Tampón de electrophoresis	125 mM Tris Base; 192 mM Glicina y SDS al 0,1%
Tampón de carga de proteínas (2x)	125 mM Tris-HCl; SDS 4% (p/v); β-mercaptoetanol 10% (p/v); Glicerol 20% (v/v) y azul de bromofenol 0,2%)
Tampón de transferencia de proteínas	25 mM Tris-HCl; 190 mM Glicina; SDS al 0,37% (p/v) y metanol al 20% (v/v)
Tampón de bloqueo para WB	leche desnatada al 4% en PBS-T (PBS 1x con 0,1% (v/v) TWEEN 20
Tampón de citometría de flujo	PBS 1x, azida sódica 0,01%, BSA 0,1%)
Tampón PBSv	0,2 M tampón fosfato salino, 0,1 M NaCl, pH 6,0
Tampón de lisis celular para ensayo de actividad caspasa efectora	50 mM HEPES 1 M pH7.4, 5 mM CHAPS, 5 mM DTT, e inhibidor de proteasas Complete®1X (Roche)
Tampón de lisis celular para fraccionamiento subcelular	20 mM HEPES-KOH pH7.5, 10 mM KCL, 1.5 mM MgCl ₂ , 1mM EDTA

Tabla 2: Listado de tampones empleados en esta Tesis, donde se explica su composición.

1.6. Purificación de ADN desde geles de agarosa

Las bandas resueltas de ADN mediante geles de agarosa se purificaron con el kit comercial “NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up” (Macherey-Nagel), siguiendo sus indicaciones las cuales están basadas en pequeñas modificaciones del protocolo de Vogelstein y Gillespie (Vogelstein and Gillespie 1979).

1.7. Defosforilación

La reacción de defosforilación de los grupos fosfato de los extremos 5' de los plásmidos digeridos se hizo para evitar su re-ligación en las reacciones de ligación con las secuencias codificantes de interés. Se realizó con el kit “Rapid Alkaline Phosphatase” (Roche Diagnostics, Suiza), siguiendo las indicaciones de la casa comercial y añadiendo 1 U de enzima por cada microgramo de plásmido previamente abierto.

1.8. Ligación

Para la ligación de los insertos con los vectores de-fosforilados se empleó el kit “Rapid DNA Ligation” (Roche Diagnostics) siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Se procedió añadiendo 1 U de enzima ligasa por reacción (10-20 μ l), que se incubó a 16°C durante 5 minutos. La mezcla de ligación resultante se utilizó para la transformación de células de *E. coli* químicamente competentes (DH5 α ™, Invitrogen).

1.9. PCR

Para la reacción en cadena de la enzima polimerasa (PCR) se usó la enzima Ex-Taq™ (Takara Bio Inc), siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. La mezcla de reacción contenía básicamente 0,5 unidades de enzima, 5 μ l de tampón 10x Ex Taq, 2,5 mM de cada dNTP, 0,25 μ M de cada cebador, 500-200 ng de ADN molde y agua miliQ hasta completar 50 μ l de volumen. La reacción se hizo en un termociclador Primus 25 Advanced (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Alemania) con el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos y 30 ciclos de 98°C durante 20 segundos (desnaturalización), 15 segundos a la temperatura de anillamiento correspondiente a cada pareja de primers determinada (ver Tabla 3) y 72°C durante 45 segundos (elongación), seguido de 7 minutos a 72°C y el mantenimiento final de las muestras a 4°C. Las variaciones de este programa básico dependieron de las características de los oligonucleótidos empleados en cada reacción (temperatura de anillamiento) y del tamaño del fragmento a amplificar (tiempo de elongación). Los oligonucleótidos usados en esta tesis fueron sintetizados por Invitrogen, y se muestran en la Tabla 3.

Nombre	Secuencia (5'---3')	T _m (°C)
<i>5Mel_Sal</i>	GATCGTCGACATGAAATTCTTAGTCAACGTTGC	57
<i>HisTAANco Rev</i>	ATCGCCATGGTTAGTGATGGTGGTGGT	58
<i>pNotI IE1 Fwd</i>	ATCGGCGGCCGCATGACTCAAATCAAC	52
<i>pPvuII XbaI IE1 Rev</i>	CGATTCTAGACAGCTGTTAGTTGAACTCG	52
<i>pMel Sal Fwd</i>	GATCGTCGACATGAAATTCTTAGTCAACGTTGC	57
<i>pHis TAA NcoI Rev</i>	ATCGCCATGGTTAGTGATGGTGGTGGT	58
<i>VP60 VP2 Xho Fw</i>	ACTGCTCGAGATAAATATGGAGGGCAAAG	55
<i>VP60 VP2 Xba Rev</i>	ACTGTCTAGAATAGCTTACTTTAAACTATAAACCCAATTAAAC	56
<i>pSf IAP Fwd</i>	CCATTGATAAAAACCGACAACC	47
<i>pSf IAP Rev</i>	AATCTCCACTTTACAGAAAGC	47
<i>pGP64-Fwd</i>	ATCACTTTGCGCACCACACG	47
<i>pGP64-Rev</i>	TTCGCGTGTCACCGACTC	47
<i>pAc IAP Fwd</i>	ATCGTTAACGGGTTTAAATAC	47
<i>pAc IAP Rev</i>	TCACTAGTACAGCGTTGATGG	47
<i>RT-KDEL Recep 2A Fwd</i>	GTGCGGGCATTTTCAGGAAAGTC	50
<i>RT-KDEL Recep 2A Rev</i>	GTAAACAGTCGCGTATGAGGCC	50
<i>RT-SF 28S rRNA Fwd</i>	GGCTTGATCCAGATGTTTCAGTACG	50
<i>RT-SF 28S rRNA Rev</i>	GCCGACATCGAAGGATCAAAAAGC	50

Tabla 3: Listado de oligonucleótidos usados en esta tesis

1.10. RT-PCR

Para la realización de la reacción en cadena de la polimerasa sobre una cadena molde de cADN obtenido por transcripción inversa a partir de un mARN, se empleó el kit “*QIAGEN® OneStep RT-PCR*” (Qiagen, Alemania) según las recomendaciones de la casa comercial. La mezcla de reacción básica contenía 2 µl de la mezcla enzimática *QIAGEN OneStep RT-PCR* (que se contiene una enzima transcriptasa reversa sensible a temperatura y una enzima ADN polimerasa acoplada a una inmunoglobulina para evitar su actividad en la reacción de transcripción inversa inicial), 10 µl de tampón 5x *QIAGEN OneStep RT-PCR*, 10 mM de cada dNTP, 0,6 µM de cada cebador, 0,32 µg de ARN molde y agua libre de nucleasas hasta completar 50 µl de volumen de reacción. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Primus 25 Advanced (PEQLAB Biotechnologie GmbH) con el siguiente programa: una reacción de transcripción inversa de 30 minutos a 50°C, seguida de una desnaturalización de cADN, inactivación de la enzima transcriptasa reversa y liberación de la ADN polimerasa a 95°C durante 15 minutos y 29 ciclos de 94°C durante 30 segundos (desnaturalización), 30 segundos a la temperatura de anillamiento correspondiente para cada pareja de cebadores utilizada (ver Tabla 3) y 72°C durante 45 segundos (elongación). Seguido de 7 minutos finales a 72°C y el mantenimiento final de las muestras a 4°C hasta su caracterización en un gel de agarosa. Los cebadores empleados fueron: *pSf IAP Fwd*, *pSf IAP Rev*, *pGP64-Fwd*, *pGP64-Rev*, *pAc IAP Fwd*, *pAc IAP Rev*, *RT-KDEL Recep 2A Fwd*, *RT-KDEL Recep 2A Rev*, *RT-SF 28S rRNA Fwd* y *RT-SF 28S rRNA Rev*.

2. Cepas bacterianas

Para el clonaje de los genes de interés en los plásmidos donadores se utilizó la cepa DH5 α TM (Invitrogen), mientras que para la generación de los bácmidos recombinantes se empleó la cepa DH10BacTM (Invitrogen), ambas de la especie *E.coli*.

2.1. Obtención de células químicamente competentes

Las células *E. coli* se pre-cultivaron durante toda la noche a 37°C en agitación orbital para, posteriormente, transferirlas a 20 ml de medio LB (Tabla 4) en el que crecieron hasta llegar a una DO_{580nm}= 400-700. En el caso de las células DH10BacTM dicha incubación se realizó en presencia de los antibióticos kanamicina y tetraciclina, ya que posee los correspondientes genes de resistencia. Una vez alcanzada DO óptima, se transfirieron a un tubo de centrífuga y se mantuvieron a 4°C durante 15 minutos. Seguidamente, se centrifugaron (6,000 x g) durante 5 minutos a 4°C y el sedimento fue resuspendido en 20 ml de tampón I (Tabla 2). Tras la resuspensión, fue nuevamente centrifugado a 4,000 x g durante 5 minutos a 4°C. El sedimento resultante fue resuspendido en 8 ml de tampón II (Tabla 2) y se repartió en alícuotas de 75 μ l. Después de una incubación de 30 minutos a 4°C, las alícuotas fueron almacenadas a -80°C hasta su uso.

2.2. Transformación de bacterias

Las cepas *E. coli* químicamente competentes fueron transformadas con los productos resultantes de las reacciones de ligación. La mezcla de DNA plasmídico y las bacterias fue incubada en hielo durante 30 minutos y sometida a un choque térmico (42°C durante 45 segundos) y una incubación en hielo de 2 minutos. Posteriormente, se añadieron 900 μ l de medio SOC (Tabla 4) y se incubó en cultivo en agitación orbital (180 rpm) a 37°C durante 1 hora para la cepa DH5 α TM o 4 horas para la cepa DH10BTM. Finalizada la incubación, el cultivo se sembró en placas de LB-agar suplementadas con los antibióticos ampicilina y gentamicina, para las células DH5 α TM, o tetraciclina, kanamicina y gentamicina, junto con X-Gal e IPTG, en el caso de DH10BacTM (Tabla 5). Las placas se mantuvieron a 37°C durante 24 horas (DH5 α TM) o durante 48 horas (DH10BacTM).

	Casa comercial	Composición	Aplicación
SOC	Invitrogen (EE.UU.)	2% Triptona 0,5% Extracto de levadura 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 20 mM Glucosa	Crecimiento de células competentes, transformadas por choque térmico
Luria Bertani (LB)	Duchefa Biochemie (Holanda)	1% Triptona 0,5% Extracto de levadura 85,55 mM NaCl 15 g/l Agar bacteriológico (solo medio sólido)	Crecimiento y mantenimiento de cepas bacterianas

Tabla 4: Listado de medios para el crecimiento de bacterias utilizados en esta tesis

Reactivo	Casa comercial	Concentración de uso
Gentamicina sulfato	PanBiotech GmbH (Alemania)	7 µg/ml
Carbencilina	Duchefa Biochemie (Holanda)	100 µg/ml
Kanamicina	Roche Diagnostics (Suiza)	50 µg/ml
Tetraciclina	Sigma Aldrich (EE.UU.)	10 µg/ml
X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosidasa)	Duchefa Biochemie (Holanda)	100 µg/ml
IPTG (Isopropil-β-D-tiogalactosidasa)	Sigma Aldrich (EE.UU.)	40 µg/ml

Tabla 5: Listado de suplementos y antibióticos de selección de cultivos bacterianos empleados en esta tesis

2.3. Generación de bácmidos

Las colonias DH10Bac™ recombinantes se seleccionaron gracias a su resistencia a los antibióticos tetraciclina, kanamicina y gentamicina y por su apariencia de color blanco en presencia de IPTG y X-gal. Para el correcto aislamiento se realizó una estría de una de estas colonias y, tras 48 horas, se procedió a su amplificación de en medio LB líquido en presencia de los tres antibióticos de selección (Tabla 5). El bácmido recombinante se extrajo según se indica en el apartado 1.1.3 y se usó para transfectar células de insecto Sf21.

3. Cultivos celulares

Las líneas celulares utilizadas han sido: la línea Sf21 (IPLB-SF21-AE), derivada del tejido ovárico del lepidóptero *Spodoptera frugiperda* (*S. frugiperda*) y la línea Sf9 (IPLB-SF9), aislado clonal de la anterior.

4. Virus recombinantes

4.1. Obtención y amplificación de los virus recombinantes

Los baculovirus recombinantes se obtuvieron mediante la transfección del bácmido correspondiente (1 µg ADN) en células Sf21 en monocapa (1×10^6 células por 9,4 cm² correspondiente a un pocillo de una placa de 6 pocillos) empleando el reactivo lipídico *Cellfectin II* (Invitrogen, EE.UU.) y siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Tras 72 horas de incubación a 27°C, se levantaron las células con el mismo medio de incubación y se centrifugaron a 700 x g durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante clarificado constituyó el pase I y se almacenó a 4°C hasta su uso. Para la generación del pase II, se infectaron células Sf21 (4×10^6 células por cada frasco de cultivo de 25 cm²) con 35 µl del pase I y se procedió a su incubación durante 72 horas a 27°C. Transcurrido este tiempo, se repitió el procedimiento anteriormente descrito para la recogida del sobrenadante. Para la generación del pase III, se repitió el procedimiento de generación del pase II, infectando a una multiplicidad de infección de 0,1 pfu por célula. En los casos que se requirió trabajar a altas multiplicidades de infección, se generaron pases IV a través de infecciones a baja MOI de cultivos de células Sf9 en suspensión.

4.2. Titulación

La titulación de los baculovirus se realizó mediante la determinación de las unidades formadoras de placas de lisis (pfu, *plaque-forming units*). Para ello, se asentaron 1×10^6 células por pocillo, completando una placa de 6 pocillos. Una vez asentadas, se les retiró el medio de cultivo y se añadió 1 ml de las diluciones seriadas (de 10^6 a 10^8) del baculovirus interés. Después de 1 hora de adsorción a 27°C, se retiró el inóculo y se añadieron 1,5 ml de agarosa de bajo punto de fusión al 1% (Invitrogen), previamente diluida en proporción 1:1 en medio TNM-FH. Una vez solidificada la agarosa, se añadieron 1,5 ml de medio de cultivo TNM-FH suplementado (Tablas 6 y 7). La titulación se incubó durante 7 días a 27°C en oscuridad. Trascurrido este tiempo, se añadió a cada pocillo 1,5 ml de la solución de tinción con rojo

neutro (Sigma-Aldrich, Reino Unido) al 0,033% en tampón PBS y, tras 24 horas a 4°C, se procedió al recuento de las placas de lisis y el cálculo del título del baculovirus (expresado en pfu/ml).

Nombre	Casa comercial		Suplementación	Aplicación
Grace's	Sigma (EE.UU.)	Aldrich	No	Transfección Titulación de baculovirus
TNM-FH	PanBiotech (Alemania)	GmbH	FBS Gentamicina sulfato L-glutamina Pluronic F-68*	Mantenimiento Infección

Tabla 6: Listado de medios de cultivo de células de insecto.

Nombre	Casa comercial	Aplicación
Gentamicina sulfato	PanBiotech GmbH (Alemania)	50 µg/ml
FBS	PanBiotech GmbH (Alemania)	10% (previamente inactivado por calor: 56°C, 30 min)
L-Glutamina	Lonza (Suiza)	4,11 mM
*Pluronic F-68	LifeTechnologies (EEUU)	0,01% (*sólo en cultivos en suspensión)

Tabla 7: Listado de suplementos al medio TNMFH

4.3. Infección

Todas las infecciones realizadas en esta tesis se hicieron con pases III titulados por duplicado, excepto aquellas realizadas a alta MOI, en las que se utilizaron pases IV titulados por duplicado.

4.3.1. Cultivos celulares en monocapas

La línea celular Sf21 se utilizó en cultivos en monocapa, una densidad de 1×10^6 en placas de 6 pocillos. Las inoculaciones se hicieron a una MOI de 0,1, 5 o 10 pfu/célula según el ensayo. Las muestras se recogieron a los diferentes tiempos desde el momento de la inoculación (0 horas) hasta las 72 hpi, especificados en cada figura.

4.3.2. Cultivos celulares en suspensión

La línea celular Sf9 se empleó en cultivo en suspensión, empleando matraces de 100 y 250 ml de volumen en agitación orbital (130 rpm). Para los ensayos con este tipo de cultivos, se empleó una MOI de 0,1 para la infección de una densidad celular en fase de crecimiento exponencial medio de 2×10^6 células/ml en medio de cultivo TNMFH suplementado (Tablas 6 y 7). La recolección de las muestras se

hizo desde las 24 hasta las 120 hpi. A lo largo del ensayo se analizó la evolución de la población celular mediante el seguimiento del recuento y la viabilidad celular por tinción con azul Trypan (Sigma-Aldrich).

5. Electroforesis de proteínas

El análisis electroforético de los extractos proteicos se llevó a cabo en condiciones desnaturizantes en geles de poliacrilamida SDS-PAGE. El gel concentrador se hizo al 4% de acrilamida:bisacrilamida (Bio Rad Laboratories), mientras que el separador se hizo al 8, 10, 12 ó 15% según la proteína interés a determinar (tampón de electroforesis: Tabla 2). Como marcador de peso molecular se utilizó *SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Protein Ladder* (Invitrogen) en los geles que iban a ser transferidos a membranas y *BenchMark™ Protein Ladder* (Invitrogen) en aquellos que iban a ser teñidos con azul de Coomassie.

Se analizaron diferentes cargas (extractos proteicos totales, extractos proteicos totales solubles, medio extracelular) por carril que fueron diluídas en proporción 1:1 (v/v) en tampón de carga 2x (Tabla 2). Seguidamente, las muestras se desnaturalizaron a 100°C durante 5 minutos. Las electroforesis se realizaron en cubetas *Miniprotean II* (Bio Rad Laboratories), a voltaje constante de 80 V hasta que las proteínas traspasaron el gel concentrador y a 150 V durante su migración a través del gel separador. Aquellos geles destinados a la tinción por azul de Coomassie (Sigma-Aldrich) al 0,3% (p/v), metanol al 45% (v/v) y ácido acético al 30% (v/v)) durante 20 minutos. Los geles fueron desteñidos, en agitación a temperatura ambiente, en una solución de metanol al 45% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v).

6. Electrotransferencia de proteínas

Las muestras resueltas por SDS-PAGE fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa *Hybond ECL* o de polifluoruro de vinilideno ó PVDF (GE HealthCare, EE.UU) con el equipo *Mini Trans-blot cell* (Bio Rad Laboratories) y un tampón de transferencia de proteínas con metanol (Tabla 2). La transferencia se realizó en frío y a voltaje constante (100V) durante 1 hora. Las membranas electrotransferidas se analizaron por medio de una tinción reversible con *Ponceau* al 0,1% (Sigma-Aldrich).

7. Inmunodetección de proteínas por *Western Blot*

Las membranas fueron incubadas en tampón de bloqueo para WB (Tabla 2) durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, fueron incubadas con los respectivos anticuerpos primarios (Tabla 8) diluidos en tampón de bloqueo, durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación constante. Tras dicha incubación, se realizaron dos lavados en PBS-T de 15 minutos de duración y seguidamente, se incubaron con los correspondientes anticuerpos secundarios (Tabla 9), diluidos en solución de bloqueo, durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación constante. Al igual que al finalizar la incubación con el anticuerpo primario, las membranas fueron lavadas en PBS-T. Para su revelado, se empleó *ECL detection kit* (GE Healthcare) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La captura de imágenes y el análisis de bandas inmunoespecíficamente detectadas se realizó con el sistema de captación de imágenes

ChemiDoc™ XRS Gel Imaging (BioRad Laboratories) y el programa informático Image Lab (versión 4.0, Bio Rad Laboratories).

Anticuerpos primarios	Casa comercial	Origen	Aplicación
Citocromo C	Pharmlingen/BD	Ratón	WB 1:500/ IF 1:200
Tubulina	Sigma	Ratón	WB 1:2000
GP64 (AcMNPV)	eBiosciences	Ratón	WB 1:1000
Histidinas	Clontech	Ratón	WB 1:1000
Hemaglutinina	Policlonal	Ratón	WB 1:500/IF 1:100/ ELISA 1:500
Ac-IE1 (AcMNPV)	Policlonal (cedido por L.Pasarelli)	Ratón	WB 1:1000
VP1 E211 (RHDV)	Ingenasa	Ratón	WB 1:1000
GFP	Milipore	Ratón	WB 1:1000
P35 (AcMNPV)	AcrisAntibodies	Conejo	WB 1:2000
Akt fosforilado en residuo Ser 473	Cell Singaling	Conejo	WB 1:1000
Akt total	Cell Singaling	Conejo	WB 1:1000

Tabla 8: Listado de anticuerpos primarios utilizados en esta tesis, se detalla la casa comercial y la dilución de uso en cada técnica en la que han sido empleados

Anticuerpos secundarios	Casa comercial	Animal de origen	Referencia
Anti-ratón-HRP	GE Healthcare	Oveja	WB 1:2000
Anti-conejo-HRP	GE Healthcare	Mono	WB 1:2000
Anti-ratón-Alexa 488	LifeTechnologies	Cabra	IF 1:200

Tabla 9: Listado de anticuerpos secundarios utilizados en esta tesis, se detalla la casa comercial y la dilución de uso.

8. Análisis y caracterización de proteínas recombinantes

8.1. Procesamiento de las muestras provenientes de cultivos celulares

8.1.1. Concentrado celular

Las muestras de cultivos en monocapa y suspensión se recogieron y centrifugaron a $700 \times g$ durante 5 minutos a 4°C , para separar el concentrado celular del medio extracelular. En la caracterización del vector TB y sus versiones (TB-B y C), se analizaron los extractos proteicos totales resultantes de la incubación de los concentrados celulares en tampón RIPA completo (Tabla 2) durante 30 minutos en hielo. En los experimentos en los que se quiso analizar la expresión intracelular de las proteínas GFP y VP60-RHDV, los concentrados celulares fueron resuspendidos en PBS 1x y se procedió a la extracción de la fracción proteica total soluble mediante tres ciclos de congelación (-196°C) y descongelación (37°C). Seguidamente se centrifugó a $17,668 \times g$ durante 5 minutos a 4°C , descartando el sedimento y alicuotando el sobrenadante, conservado a -20°C hasta su posterior análisis (Gómez-Sebastián, López-Vidal et al. 2014, López-Vidal, Gómez-Sebastián et al. 2015). En los casos de la expresión de la glicoproteína HA-AIV, se siguió el protocolo descrito anteriormente (Gomez-Casado, Gomez-Sebastian et al. 2011), basado en la ruptura por congelación/descongelación descrita en el párrafo anterior pero en este caso en presencia del tampón de extracción para esta glicoproteína (Tabla 2). En todos los casos, una vez extraído el contenido intracelular, se almacenó a -20°C para su posterior análisis.

8.1.2. Medioextracelular

El medio extracelular se obtuvo de la centrifugación para la separación entre las células y el medio extracelular y se almacenó a 4°C para su posterior análisis.

8.2. Determinación de la cantidad de proteína contenida en los extractos intracelulares

La determinación de la cantidad de proteína presente en los extractos proteicos se realizó mediante el método espectrofotométrico de Bradford (Bradford 1976) empleando *Quick Start™ Bradford Protein Assay* (Bio Rad Laboratories) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las determinaciones se realizaron por duplicado, leyendo la absorbancia a 595 nm, en un espectrofotómetro Boeco S30 (Boeco, Alemania). La cuantificación se realizó a partir de una curva de calibración realizada con 6 diluciones de concentraciones conocidas de albúmina bovina (Sigma-Aldrich).

8.3. Caracterización de las proteínas recombinantes expresadas

8.3.1. Fluorimetría

La cuantificación fluorimétrica de la emisión de la proteína testigo verde fluorescente (GFP) se llevó a cabo en el lector de placas Tecan GENios® (Tecan, Suiza), a partir de $15 \mu\text{g}$ de extracto proteico total soluble de cada muestra, utilizando para ello $\lambda_{\text{Ex}} = 485 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{Em}} = 535 \text{ nm}$, como longitudes de onda de excitación y de emisión respectivamente. Los datos de emisión de fluorescencia fueron recogidos por el programa XFluor4 (Tecan). Como muestra control de la señal intrínseca de fluorescencia presente en los

extractos proteicos de células infectadas con baculovirus, se utilizaron 15 µg de extracto proteico total de células infectadas con el baculovirus BacNi.

8.3.2. Análisis de la expresión máxima de fluorescencia por citometría de flujo

Los porcentajes de población de células infectadas por el vector Convencional, el vector TB o sus dos versiones alternativas (TB-B y TB-C) fueron detectados por citometría de flujo. Para ello, se infectaron células Sf9 crecidas en cultivos en suspensión a una densidad poblacional de 2×10^6 células/ml, a una MOI de 0,1 pfu/célula. Desde las 24 hpi hasta las 120 hpi, se tomaron alícuotas de 2 ml de cultivo infectado, de los cuales 100 µl fueron analizados por el citómetro de flujo, disueltos en tampón de citometría de flujo (Tabla 2). Se muestrearon 10000 eventos por muestra adquirida para la señal del láser L1 y se representaron los datos del porcentaje de eventos que mostraron mayor la máxima señal de fluorescencia, determinada como una señal de láser L1 superior a 10^4 .

8.3.3. Análisis semi-cuantitativo por Western Blot

La semi-cuantificación de la proteína HA¹⁸⁻⁵²⁹ fue realizada mediante *Western blot* tras separar las muestras electroforéticamente en geles de poli-acrilamida al 8%. La cantidad de proteína obtenida fue normalizada con una curva patrón de proteína HA¹⁸⁻⁵²⁹ de concentración conocida; así se relacionó la densidad de las bandas inmuno-reactivas con la concentración final de proteína recombinante en cada muestra obteniendo una concentración semi-cuantitativa de la misma en los extractos analizados.

La semi-cuantificación de la proteína VP60 fue realizada mediante una curva patrón con cantidades conocidas de la proteína BSA, resueltas en geles de poli-acrilamida al 10% teñidos con azul de Coomassie.

8.3.4. Análisis de N-glicosilación indirecta de glicoproteínas

Para la completa caracterización de la secreción de HA¹⁸⁻⁵²⁹, expresada en infecciones tanto en cultivo celular como en larvas, se procedió a la identificación de la presencia indirecta de N-glicosilación a través del tratamiento con la enzima de-glicosilasa PNGasa F (New England Biolabs). Esta enzima reconoce y procesa proteolíticamente oligosacáridos complejos, híbridos o residuos de manosa superiores. Para la realización de esta reacción se siguieron las recomendaciones del fabricante, en las que semejantes volúmenes de medio extracelular provenientes de infecciones con los vectores Convencional y TB, fueron previamente desnaturalizados mediante su incubación a 100°C durante 10 min en presencia de tampón de desnaturalización de glicoproteínas (New England Biolabs), antes de ser tratados con 500 U de la enzima durante 1 h a 37°C. La reacción se detuvo al hervir la muestra durante 5 minutos en presencia de tampón de carga. Después, las muestras fueron resueltas en un gel de poli-acrilamida al 8% y transferidas a una membrana de nitrocelulosa para ser detectadas inmuno-específicamente por los correspondientes anticuerpos (Tabla 8). Como control negativo de la eliminación de los N-glicanos, se resolvieron muestras del mismo origen sin recibir este tratamiento y como control positivo, una alícuota de HAHis purificada tratada siguiendo el mismo protocolo.

8.3.5. Análisis por ELISA indirecto

Para la caracterización en condiciones nativas de la secreción de la proteína HA¹⁸⁻⁵²⁹ al medio extracelular en los cultivos de Sf9 infectados con los respectivos vectores recombinantes, se realizó un ensayo de ELISA indirecto en el que se recubrieron placas de 96 pocillos (MW96; Nunc, Dinamarca) con diluciones seriadas del medio extracelular de los vectores Convencional y TB, recogidos a sus tiempos óptimos de producción. Se comenzó con una dilución 1/160 del medio extracelular en tampón carbonato-bicarbonato pH 9,6 (Sigma-Aldrich). Tras fijar el antígeno a la placa durante una incubación nocturna a 4°C, se procedió a realizar 4 lavados con PBS-T y al bloqueo de la misma durante 1 h a 37°C con la solución de bloqueo PBS-T y albúmina bovina al 2% (p/v; Sigma-Aldrich). Tras secar debidamente la placa, se procedió a la incubación del anticuerpo primario (anti-HA, Tabla 8) durante 1 h a 37°C, seguida de tres lavados con PBS-T. Posteriormente, se ejecutó el mismo protocolo de incubación y lavados para el anticuerpo secundario (anti-ratón-HRP, Tabla 9) y, finalmente, se procedió al revelado de la placa con el sustrato ABTS (Roche), el cual reacciona con la HRP (*horse rabish peroxidase*) que esta conjugada al anticuerpo secundario. La absorbancia fue medida a $\lambda=405$ nm en un lector de microplacas de ELISA (Multiskan EX, Thermo Electron Corp, USA). El punto de corte a partir del cual las muestras se consideran negativas es D.O._{405 nm} = 0,15.

8.3.6. Inmunofluorescencias

Para la detección de la liberación de citocromo C del espacio intermembrana mitocondrial, se empleó un protocolo basado en el descrito por Liu y colaboradores (Liu, Shu et al. 2012): 2,5*10⁵ células Sf21 fueron asentadas en los pocillos de una placa de 24 pocillos (Nunc), en los que previamente se colocó un cubreobjetos de cristal estéril. Una vez asentadas sobre los cristales, se procedió a la pre-adsorción vírica incubando los cultivos con los inóculos a MOI=5 durante 1h y 30 minutos a 27°C. Tras esta pre-adsorción, se retiró el inóculo y se incubaron las preparaciones a 27°C hasta las 12 hpi. Posteriormente, las preparaciones fueron lavadas 2 veces con PBS 1x y se procedió a la tinción de las mitocondrias a través de la incubación con MitoTracker Red CMXRos (100 nM, LifeTechnologies) en PBS1x-0,8% BSA durante 15 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz. Seguidamente, se lavaron las muestras 2 veces con PBS 1x y se procedió a su fijación con paraformaldehído al 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Una vez fijadas, las preparaciones fueron permeabilizadas a través de una incubación con la solución de permeabilización (PBS 1x-Tritón X-100 0,1%) durante 5 minutos a temperatura ambiente, seguida de tres lavados con PBS 1x para limpiar los restos de dicha solución antes de comenzar el bloqueo de las muestras en solución PBS1x-1% BSA durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras finalizar el bloqueo, las muestras fueron incubadas con el anticuerpo primario (anti-Citocromo C, Tabla 8), diluido en solución de bloqueo, durante toda la noche a 4°C. Una vez finalizada la incubación del anticuerpo primario, las muestras fueron lavadas 3 veces en PBS 1x e incubadas en la dilución correspondiente del anticuerpo secundario conjugado con el fluorocromo Alexa 488 (Tabla 9) durante 90 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz. Nuevamente, se realizaron 3 lavados en

PBS 1x y se procedió a su montaje en portaobjetos de cristal, utilizando ProLong® (Invitrogen) como medio de montaje. Una vez montadas, las muestras fueron guardadas a oscuras y a 4°C hasta su análisis al microscopio.

Con objeto de confirmar el posible patrón de secreción de HA en combinación con la secuencia señal KDEL, se asentaron $2,5 \times 10^5$ células Sf21 por pocillo de una placa de 24 pocillos (Nunc). Previamente sobre esos pocillos, se habían colocado cubreobjetos recubiertos con 0,1 mg/ml de poly-lisina D (Sigma-Aldrich). Una vez asentadas, los cultivos celulares fueron infectados a MOI = 5, permitiendo su infección a 27°C hasta las 48 hpi, cuando fueron lavadas con PBS 1x y fijadas con paraformaldehído (4%). Una vez fijadas y sin permeabilizar de manera alguna las preparaciones, se procedió a incubarlas durante 30 minutos a temperatura ambiente en presencia de la solución de bloqueo compuesta por PBS 1x-1% BSA. Seguidamente, fueron incubadas con el anticuerpo primario (anti-HA, Tabla 7) en solución de bloqueo durante 1 h a 37°C. Posteriormente, se procedió a incubar con el anticuerpo secundario (Alexa 488, Tabla 8) y al montaje de las preparaciones como se menciona anteriormente.

8.3.7. Purificación de VLPs

Las VLPs fueron extraídas de los concentrados celulares procedentes de la infección de cultivo de células Sf9 en suspensión infectadas con los respectivos vectores, siguiendo el protocolo previamente descrito por Crisci y colaboradores (Crisci, Fraile et al. 2012). Brevemente, se recogieron los citados concentrados celulares a las 96 hpi mediante centrifugación (700 x g, 5 min, 4°C) y se lavaron 2 veces con PBS 1x. Posteriormente fueron resuspendidos en agua destilada en presencia de inhibidores de proteasas (Complete®, Roche) para producir la lisis celular. Seguidamente fueron tratados con DNase I (Roche) e incubados durante 1 h a 37°C para eliminar los restos de ADN celular presente en los lisados celulares. Tras esta incubación, a las muestras se les añadió Sarkosyl al 2% (N-lauroilsarconina sódica, Sigma) y 5 mM EDTA (Sigma) en un tampón PBSv (Tabla 2), y permanecieron durante la noche a 4°C. Después de una centrifugación adicional (2,000 x g, 5 minutos), los sobrenadantes se sometieron a ultra-centrifugación (131,453 x g; 150 minutos). Los sedimentos resultantes fueron tratados por duplicado con Vertrel (Sigma) y sometidos a otra ultra-centrifugación (131,453 x g; 150 minutos). Finalmente, los sedimentos fueron resuspendidos en PBS 1x y almacenados a 4°C hasta su análisis.

9. Microscopía

9.1. Microscopía confocal

Se empleó un microscopio Leica TCS SPE (Leica, Alemania), utilizando un objetivo de 63X y aceite de inmersión. El procesamiento de las imágenes se realizó con los programas Leica Application Suite Advanced Fluorescence (LASAF, Leica) y Adobe Photoshop CS6 (Adobe Systems Incorporated, EE.UU.)

9.2. Microscopía electrónica

Las muestras de células infectadas se analizaron en el servicio de microscopia electrónica del Centro Nacional de Biotecnología (CNB, Madrid). Las muestras se depositaron en rejillas cubiertas de cobre con película de polivinilo, durante 1 minuto. La rejilla se sumergió en acetato de uranilo al 2% durante 2 minutos, dejándose secar al aire a temperatura ambiente. Las preparaciones fueron observadas empleando un microscopio electrónico JEM 2000 Ex (JEOL, Japón).

10. Determinación bioquímica de la viabilidad de los cultivos infectados

La determinación bioquímica de la viabilidad de los cultivos infectados fue realizada a través del kit comercial CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega), siguiendo las indicaciones del fabricante. Este test de viabilidad se basa en la reducción de una sal de tetrazolium (MTS, [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] en combinación con un reactivo donador de electrones (PMS, phenazine methosulfate), llevada a cabo por las células metabólicamente viables gracias a las enzimas dehidrogenasas presentes en sus mitocondrias (Cory, Owen et al. 1991). La bio-reducción del MTS genera formazan, un compuesto soluble en el medio celular, cuantificable y directamente proporcional al número de células vivas. Para llevar a cabo este ensayo, se utilizaron placas de 96 pocillos (CytoOne) en las que se asentaron $3,3 \times 10^4$ células Sf21 por pocillo, las cuales fueron infectadas a una MOI de 5 pfu/célula completando hasta un volumen final por pocillo de 100 μ l con medio TNMFH suplementado (Tablas 6 y 7). Las infecciones fueron incubadas a 27°C hasta tiempos tardíos y muy tardíos de la infección (48-96 hpi). Para su análisis, se incubaron 20 μ l de la solución MTS:PMS (20:1, v/v) por pocillo durante 4 h a 27°C en oscuridad, tras lo cual se procedió a la lectura de la placa en un lector de microplacas de ELISA (Multiskan EX, Thermo Electron Corp, USA) a la longitud de onda $\lambda = 490$ nm. Los datos de densidad óptica obtenidos con esta técnica de 5 ensayos independientes han sido estadísticamente analizados en este trabajo de tesis

11. Purificación de partículas víricas de baculovirus

Los reservorios de virion brotante (BV) pertenecientes a los baculovirus recombinantes Convencional y TB destinados a su resolución a través de técnicas electroforéticas fueron purificados según el protocolo de ultracentrifugación descrito por O'Reilly y colaboradores (O'Reilly, Miller et al. 1994), con modificaciones en los volúmenes de trabajo (máximo 12 ml por tubo por empleo del rotor SW41, Beckman, EE.UU.). Las partículas víricas purificadas fueron resuspendidas en tampón PBS 1x a 4°C durante una noche y precipitadas en 3 volúmenes de acetona a -20°C. Finalmente fueron centrifugadas (11,000 x g, 10 minutos, 4°C) para su posterior análisis en SDS-PAGE mediante geles de poliacrilamida al 8%.

12. Fraccionamiento subcelular

Para el estudio de la liberación de citocromo C de las mitocondrias al citosol asociada a la infección por baculovirus, se siguió una modificación del procedimiento de fraccionamiento celular

descrito por Kumarswamy y colaboradores (Kumarswamy, Seth et al. 2009). En este caso, células Sf9 fueron cultivadas en suspensión e infectadas a baja multiplicidad de infección (MOI = 0,1). A las 12 hpi se tomaron muestras para proceder a la determinación de la población total de células y se tomaron alícuotas de 1×10^7 células totales, las cuales fueron centrifugadas para concentrar todas las células. Seguidamente, se procedió a lavar las muestras 2 veces con tampón PBS 1x, y tras el segundo lavado, fueron resuspendidas en 600 μ l del tampón de lisis celular para fraccionamiento subcelular (Tabla 2). Una vez obtenida una solución homogénea, la muestra fue incubada durante 5 minutos en hielo. Seguidamente, las células fueron lisadas por presión al hacer pasar la muestra 20 veces por una jeringa de 5 ml (BD Becton, Dickinson, EE.UU.) acoplada a una aguja de caudal 25 (BD Becton, Dickinson). Tras la ruptura por presión mecánica, los restos nucleares y células no lisadas fueron separados del resto de los elementos del citoplasma a través de una centrifugación a $1,000 \times g$ durante 5 minutos a 4°C (Hershberger, LaCount et al. 1994). Tras esta centrifugación, se descartó el sedimento y se siguió trabajando con el sobrenadante, el cual fue centrifugado de nuevo a $21,000 \times g$ durante 20 minutos a 4°C . El sedimento resultante de esta centrifugación, que contenía el contenido mitocondrial del cultivo y otros elementos membranosos de mayor peso del citosol, fue lavado cuidadosamente con 100 μ l de PBS 1x y centrifugado a $2,010 \times g$ durante 5 minutos y a 4°C y fue congelado hasta su uso. El sobrenadante recogido, constituido por el resto de elementos citosólicos de menor peso y los restos de membrana plasmática, fue sometido a un tratamiento de precipitación proteica a través de la incubación con 3 volúmenes de acetona fría, incubándose durante varios días a -20°C . Posteriormente, la acetona fue retirada por centrifugación ($11,000 \times g$, 10 minutos, 4°C) y el sedimento proteico resultante fue disuelto en 50 μ l de agua destilada. Finalmente, las muestras fueron resueltas en condiciones desnaturalizantes, utilizando geles de poliacrilamida con un porcentaje del 15 % para el gel separador.

13. Detección fluorimétrica de actividad caspasa

Para el estudio de la cinética de actividad de caspasas efectoras en células de insecto por infección con los baculovirus recombinantes se utilizó una modificación del protocolo descrito por Liu y colaboradores (Liu, Shu et al. 2012). Células Sf21 creciendo en monocapa fueron distribuidas en placas de 6 pocillos (CytoOne), a una densidad poblacional de 1×10^6 células por pocillo. Una vez las células estuvieron asentadas, se retiró el medio y se añadió 1 ml de inóculo correspondiente a 5 pfu/célula. El inóculo fue pre-adsorbido durante 1 h y 30 minutos a 27°C , tras lo cual se reemplazó por 2 ml de medio TNMFH suplementado (Tablas 6 y 7)), considerando este momento como $T = 0$ hpi. Durante los sucesivos tiempos de muestreo (12, 24, 48 y 72 hpi), las células infectadas fueron recogidas por pipeteo y mantenidas en hielo hasta que se procedió a la concentración del cultivo con un pulso rápido de centrifuga a máxima velocidad. Una vez concentradas, las células fueron lavadas dos veces con PBS 1x, retirando cuidadosamente el segundo lavado para proceder a la lisis celular. El lisado celular para el ensayo de actividad caspasa efectora se obtuvo gracias a la resuspensión en el tampón de lisis celular para ensayo de actividad caspasa (Tabla 2). Las muestras fueron incubadas en dicho tampón durante 20 minutos en hielo

para posteriormente ser centrifugada a 16,080 x g, tras lo cual el sobrenadante fue almacenado a -80°C hasta terminar la recogida del resto de muestras y proceder a su análisis. Una vez recogidas todas las muestras, se procedió a la detección de la actividad caspasa en los diferentes tiempos considerados en esta cinética a través de la incubación en una placa de 96 pocillos de fondo negro (Nunc) de 10 µl del sobrenadante con 200 µl de la mezcla de reacción para caspasa efectora, la cual se compone de la mezcla del sustrato colorimétrico Ac-DEVD-AMC (10 mM, Sigma) y el tampón de ensayo (CASP3-F, Sigma: 20 mM HEPES pH 7.4, 0,1% CHAPS, 10 mM DTT, 20 mM EDTA) en una proporción 1:600 (v/v). La reacción se incubó en oscuridad y agitación durante 1 hora. Finalmente, la intensidad de señal fluorescente de la placa fue recogida a través del lector de placas TECAN Genios y el programa Xfluo4 (λ_{exc} = 360 nm, λ_{em} =465 nm, Tecan, Suiza).

En los ensayos de detección de actividad caspasa efectora bajo infección por baculovirus recombinantes en condiciones de estrés celular, se procedió a intercalar en el procedimiento descrito anteriormente, un paso de incubación con 250 ng/ml de Actinomicina D (Sigma) durante 4 h, tomando como tiempo 0 hpi la misma referencia previamente mencionada en este apartado.

Para la cinética de actividad de caspasas efectoras en células de insecto bajo incubación con la droga inductora actinomicina D (Sigma), se siguió el mismo protocolo descrito anteriormente sólo que realizando la incubación de las células con medio con o sin droga añadida (250 ng/ml) y recogiendo las muestras hasta las 96 hpi.

En cuanto a los ensayos de cinética de actividad de caspasas iniciadoras se siguió el mismo protocolo de infección descrito para la cinética de actividad caspasa efectora, pero se utilizó el kit comercial Caspase-9 Fluorometric Assay Kit (Biovision, EE.UU.), que incorporaba su propio tampón de extracción, sustrato (Ac-LEHD-AFC), siguiendo las indicaciones del fabricante.

14. Detección de la activación de rutas de proliferación y supervivencia

Para poder detectar la activación de rutas de proliferación y supervivencia en células de insecto infectadas con los distintos baculovirus empleados, se siguió el protocolo descrito por Xiao y colaboradores (Xiao, Yang et al. 2009), en el que se priva a las células Sf21 asentadas en monocapa de suero incubándolas toda la noche a 27°C en presencia de medio sin suero. En nuestro caso, al realizar el ensayo en placas de 6 pocillos (CytoOne), las células se incubaron en 2 ml de medio sin suero SF 900 II SFM (Gibco-Invitrogen). Seguidamente, la infección y recogida se realizó según los protocolos ya descritos en este trabajo de tesis, con la salvedad de utilizar el citado medio sin suero. En el momento de recogida (2 hpi), las células fueron levantadas por pipeteo y pasadas a un tubo de centrifuga para ser concentradas mediante centrifugación 1 minuto a máxima velocidad, tras lo que se retiró el sobrenadante. El concentrado celular resultante fue procesado en incubación con 30 µl de tampón RIPA completo (Tabla 7), suplementado con inhibidor de fosfatasas (1x, Roche), durante 20 minutos en hielo. Los extractos proteicos totales obtenidos de este procesamiento fueron resueltos electroforéticamente en geles de

acrilamida 10% seguido de inmunodetección de la proteína Akt activa (fosforilada en su residuo Ser473) y Akt total (Tablas 8 y 9).

15. Análisis estadístico de los datos

Los gráficos representados en esta tesis se corresponden con los valores medios de los datos obtenidos junto con su desviación estándar. El análisis de la varianza de los datos junto con el test post hoc tipo Bonferroni para comparaciones múltiples se realizó con el programa informático GraphPad Prism versión 5.00 para Windows (GraphPad Software, EE.UU.). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando el p-valor obtenido fue menor de 0,05 (*), de 0,01 (**) ó de 0,001 (***).

Resultados

El vector TB, previamente desarrollado en nuestro laboratorio, presenta en su esqueleto el cADN codificante para la expresión de los factores inmediatamente tempranos *Ac-IE0* e *IE1*, ambos *per se* existentes en el genoma del baculovirus. Sin embargo, se desconocía el efecto del patrón de expresión de estos factores con una copia adicional regulada bajo el control de un promotor más potente que el suyo natural sobre el curso de la infección en células de insecto. De tal manera que se procedió a su caracterización.

1. Caracterización de la sobre-expresión del cADN *Ac-ie-01* presente en el vector TB en el contexto de la infección de células de insecto

En primer lugar, se quiso constatar que efectivamente la secuencia *Ac-ie-01* estaba siendo correctamente sobre-expresada bajo el promotor *polihedrina* en el vector TB (Figura 5). Para ello, se infectaron células Sf21 a una MOI de 1 pfu/célula con los vectores recombinantes Convencional y TB (Figura S-7). Estas células se recogieron a los distintos tiempos post-infección para extraer su contenido proteico y analizarlo mediante técnicas electroforéticas. La detección inmuno-específica se realizó mediante el uso del anticuerpo específico de la proteína *Ac-IE1*, con lo que se pudo observar cómo a tiempos tempranos de la infección (6-12 hpi), la expresión de los factores transactivadores estaba regulada por sus propios promotores *Ac-ie-0* e *ie-1* y apenas difería entre los extractos procedentes de sendas infecciones (Figura 5.A). De esta manera, se pudo observar que el promotor *Ac-ie-0* a partir las 6 hpi comenzó a reducir paulatinamente su actividad, detectándose menos cantidad de *Ac-IE0* que de *Ac-IE1*, cuya expresión fue en aumento en ambas infecciones. A partir de las 48 hpi, momento en el que el promotor *polihedrina* es plenamente funcional, sí que se detectaron diferencias a nivel del patrón de expresión de los transactivadores en los extractos procedentes de la infección con el vector TB respecto a los procedentes de la infección con el vector Convencional (Figura 5.B). A las 48 hpi, en los extractos procedentes de los cultivos infectados con el vector Convencional se observó que la presencia de *Ac-IE0* era prácticamente nula mientras que la de *Ac-IE1*, tras haber alcanzado su pico máximo de expresión, disminuyó hasta ser detectada tenuemente a las 72 hpi (Figura 5.B). En contraposición y debido a la copia adicional de la secuencia *Ac-ie-01* bajo el promotor *polihedrina*, en los extractos procedentes de la infección con el vector TB se constató una tendencia radicalmente opuesta: no sólo se mantuvo la expresión de la proteína *Ac-IE1* durante los tiempos tardíos sino que la expresión de la proteína *Ac-IE0* se incrementó con el transcurso de la infección (Figura 5.B).

A raíz de la observación del cambio en el patrón de expresión de los factores de transcripción en los extractos celulares provenientes de la infección con el vector TB, se analizó si la sobre-expresión podía repercutir en que estos factores fuesen aleatoriamente incorporados en las formas brotantes del virus durante su empaquetamiento (Figura 5.C). Para ello, se resolvieron electroforéticamente partículas víricas purificadas procedentes de infecciones con el vector Convencional o el vector TB (Apartado 11, sección Materiales y Métodos). Como control positivo para la correcta carga de partículas víricas, se analizó la presencia de la glicoproteína de envuelta de baculovirus *Ac-GP64*, (Figura 5.C, Panel *Ac-*

GP64). Ninguna muestra de virus purificado mostró por inmunodetección mediante WB la presencia de estas proteínas en la partícula vírica purificada (Figura 5.C, Panel Ac-IE0/IE1). Esta observación nos hizo descartar que cualquier efecto temprano que pudiéramos posteriormente observar en cultivos celulares de insecto infectados con el vector TB estuviera relacionado con la presencia de los factores proteicos sobre-expresados Ac-IE0 e IE1 como componente estructural de la partícula de los baculovirus.

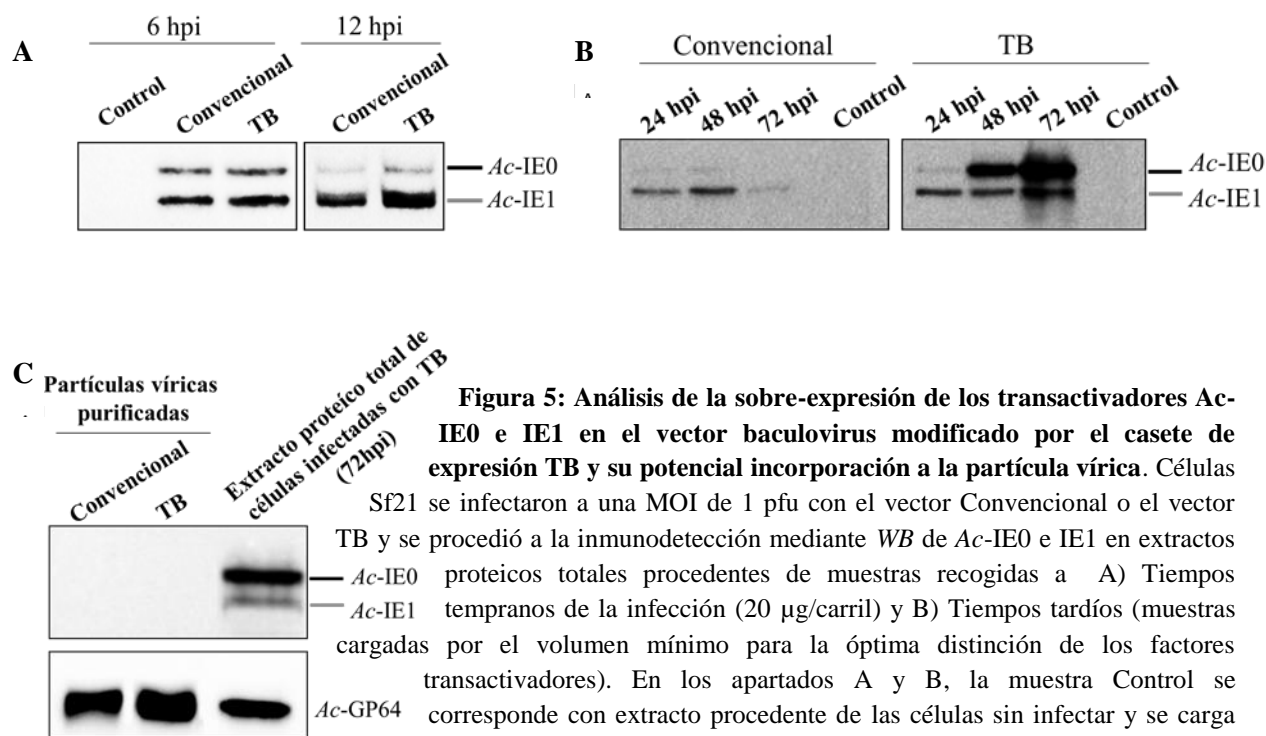


Figura 5: Análisis de la sobre-expresión de los transactivadores Ac-IE0 e IE1 en el vector baculovirus modificado por el casete de expresión TB y su potencial incorporación a la partícula vírica.

Células Sf21 se infectaron a una MOI de 1 pfu con el vector Conventional o el vector TB y se procedió a la inmunodetección mediante WB de Ac-IE0 e IE1 en extractos proteicos totales procedentes de muestras recogidas a A) Tiempos tempranos de la infección (20 µg/carril) y B) Tiempos tardíos (muestras cargadas por el volumen mínimo para la óptima distinción de los factores transactivadores). En los apartados A y B, la muestra Control se corresponde con extracto procedente de las células sin infectar y se carga de manera equivalente al resto de muestras.

C) Análisis de partículas víricas purificadas de vector Conventional y TB para la inmunodetección de Ac-GP64 y la posible incorporación aleatoria de Ac-IE0 e IE1 sobre-expresadas en las partículas de TB.

Seguidamente, se constató si la copia adicional de cADN *Ac-ie-01* presente en el genoma del vector TB podría repercutir en la producción de progenie vírica (Figura 6). Para ello, se analizó el patrón temporal de expresión de la glicoproteína de envuelta Ac-GP64 de manera comparativa en extractos proteicos procedentes de células Sf21 infectadas a una MOI de 1 pfu con el vector Conventional o con el vector TB (Figura 6.A). A través de la inmunodetección específica para esta proteína vírica de envuelta, no se detectaron diferencias en su expresión que pudiesen denotar diferencias a nivel de producción de progenie vírica a ninguno de los tiempos muestreados (6-72 hpi). En consonancia, las titulaciones de los sobrenadantes de las infecciones recogidos a las 72 hpi no mostraron diferencias significativas en producción de partículas víricas infectivas entre el vector Conventional y el vector TB (Figura 6.B).

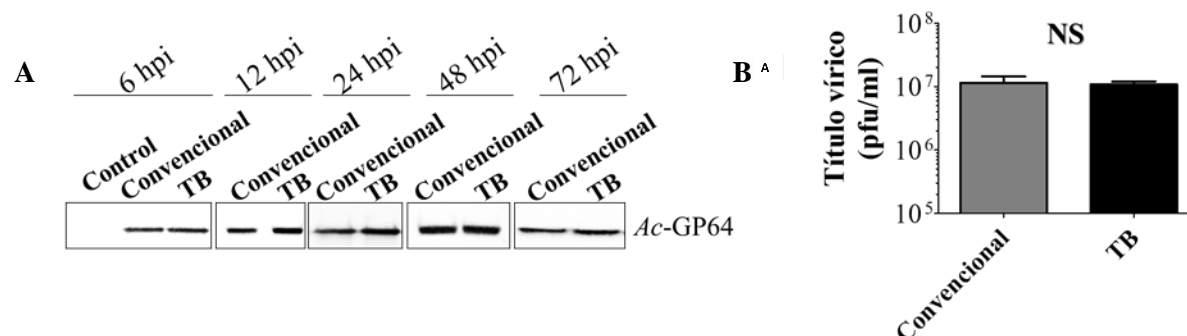


Figura 6: Caracterización de la sobre-expresión de Ac-ie-01 en el vector TB en términos de producción de progenie vírica. A) Cinética de expresión de la glicoproteína Ac-GP64 durante el transcurso de la infección en células Sf21 infectadas a MOI de 1 pfu con el vector Convencional o con el vector TB (20 µg de extracto proteico total de cada muestra por carril). La muestra Control se corresponde con extracto procedente de las células sin infectar y se carga de manera equivalente al resto de muestras. B) Titulación por triplicado de los sobrenadantes de las infecciones citadas en el apartado A (recogidos a las 72 hpi, Convencional: barra gris; TB: barra negra).

2. Caracterización del retardo en la aparición del efecto citopático (CPE), denominado *efecto protector*, observado en cultivos celulares infectados con el vector TB respecto a los infectados con el vector Convencional

2.1. Estudio del *efecto protector* en relación a la viabilidad e integridad del cultivo infectado

Como se explica detalladamente en la introducción de esta Tesis, los baculovirus se caracterizan por desarrollar un drástico CPE en la célula huésped a tiempos tardíos de la infección. El retardo en su aparición supondría una ventaja productiva al poderse incrementar el periodo óptimo de producción de proteínas de interés con la tecnología BEVS. Así, en trabajos previos del laboratorio y durante el desarrollo de este trabajo de Tesis, se observó una funcionalidad prolongada durante la infección de los cultivos celulares infectados con el vector TB con respecto a los infectados con un vector Convencional, medida de diferentes maneras. Ello nos hizo centrarnos en la caracterización de este efecto mediante el estudio comparativo del estado de viabilidad e integridad de los cultivos infectados con el vector TB respecto a las infecciones con el vector Convencional (Figura 7). A lo largo de diferentes ensayos, se recopilaron los datos de viabilidad de cultivos de células Sf9 infectados a baja MOI (0,1 pfu/célula) a través de contajes celulares con la tinción excluyente con el colorante azul trypan (Figura 7.A). Desde las 72 hpi hasta el final del ensayo, los porcentajes de viabilidad mostrados por los cultivos infectados con el vector TB fueron significativamente mayores que los mostrados por los cultivos infectados con el vector Convencional. También, al observar en detalle células de estos cultivos utilizando técnicas de microscopía electrónica (Figura 7.B), se comprobó que los porcentajes de viabilidad registrados correlacionaban con un mayor número de células íntegras en el caso de las infecciones realizadas con el vector TB. Además, al analizar la tubulina intracelular mediante electroforesis e inmunodetección mediante WB a partir de extractos proteicos procedentes de cultivos infectados se constató que la proporción de esta proteína presente en el extracto proteico de las células infectadas con el vector Convencional experimentaba una disminución gradual a lo largo de los tiempos post-infección (Figura

7.B, Convencional, tubulina). En contraposición, las muestras procedentes de la infección con el vector TB presentaron una cantidad de tubulina más constante y estable, cuya disminución se inició al menos 24 h después de que lo hiciese en los extractos procedentes del cultivo infectado con el vector Convencional (Figura 7.B, TB, tubulina).

Como prueba bioquímica que reafirmase los datos de viabilidad obtenidos a través de la monitorización visual, se realizó un ensayo de actividad mitocondrial en células Sf21 infectadas con los vectores anteriormente citados. Para este ensayo, se analizó la capacidad de las mitocondrias de los cultivos infectados de reducir el MTS a formazán (Apartado 10, sección Materiales y Métodos). Nuevamente, a partir de las 72 hpi se observó que la actividad reductora mitocondrial, detectada por un incremento relativo de la densidad óptica del formazán soluble generado, fue significativamente mayor en los cultivos celulares infectados con el vector TB respecto de aquellos infectados con el vector Convencional (Figura 7.C), correlacionando con las observaciones previas de integridad y viabilidad celular descritas (Figura 7.A y B).

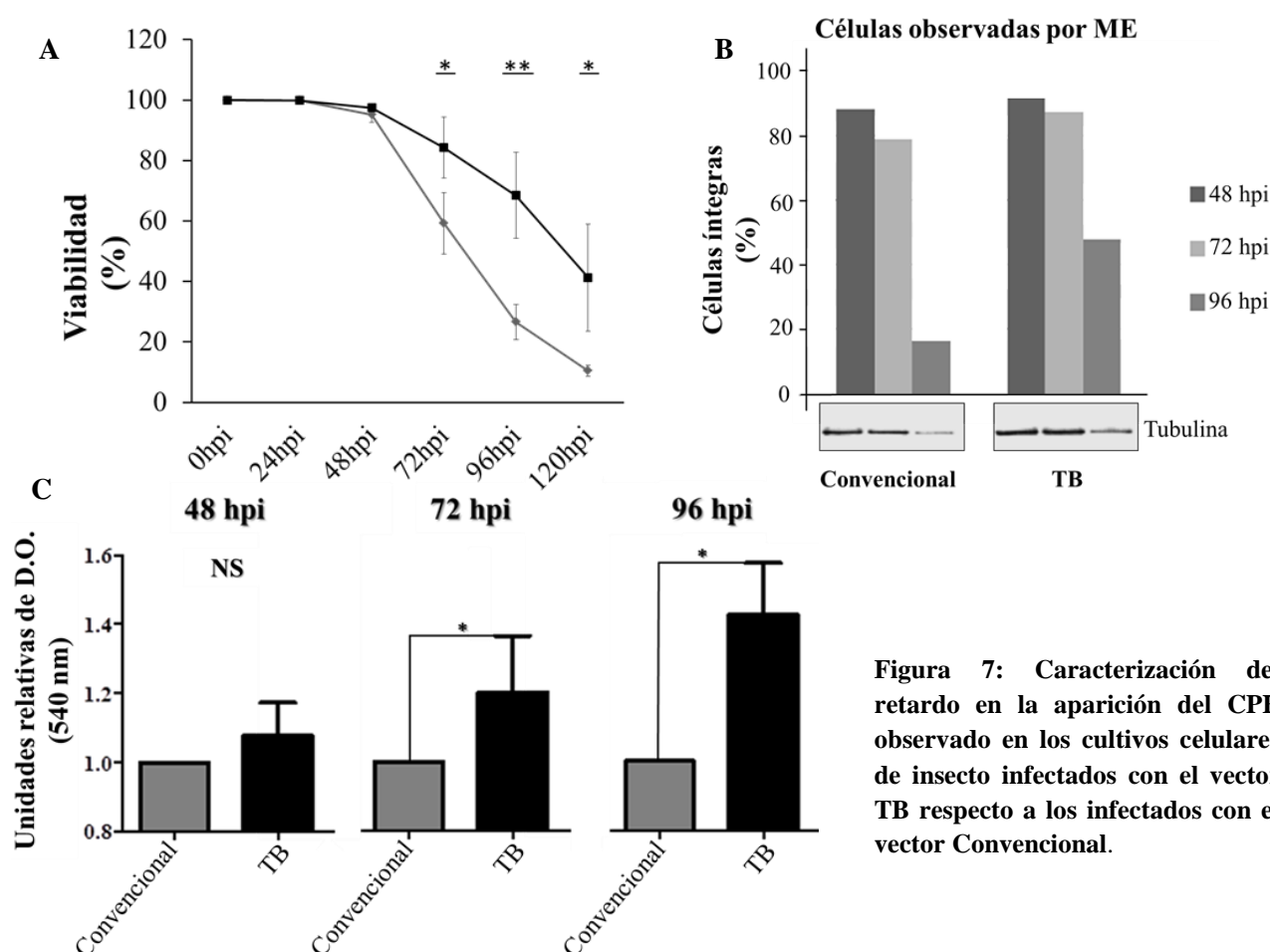


Figura 7: Caracterización del retardo en la aparición del CPE observado en los cultivos celulares de insecto infectados con el vector TB respecto a los infectados con el vector Convencional.

A) Monitorización de la viabilidad celular (tinción excluyente con azul trypan) de cultivos en suspensión de células Sf9 infectadas a baja MOI (n=3) con el vector TB (■) y con el vector Convencional (◆). B) Análisis de la conservación de la integridad celular de los cultivos citados en el Apartado A a tiempos tardíos (48-96 hpi) mediante técnicas de conteo en el ME. Para el análisis de degradación de la tubulina se usaron 5 µg de extracto

proteico soluble de estos cultivos, que fueron separados electroforéticamente y analizados mediante WB con un anticuerpo específico frente a tubulina. C) Estudio indirecto de la viabilidad de células Sf21 infectadas a alta MOI (5 pfu/célula) con el vector TB (barras negras) o con el vector Convencional (barras grises) representada por la actividad reductora mitocondrial a tiempos tardíos de la infección (48-96 hpi), relativizada a la actividad presentada por los cultivos infectados con el vector Convencional (n=5). Los asteriscos representan las diferencias significativas (* p-valor < 0,05; ** p-valor < 0,01).

2.2. Estudio de la integridad mitocondrial en cultivos infectados con el vector TB

Las mitocondrias son un orgánulo clave, no sólo como central energética celular sino también en procesos de apoptosis. En el apartado anterior de este trabajo de Tesis observamos diferencias significativas en la actividad mitocondrial mostrada entre cultivos celulares infectados con el vector Convencional o el vector TB (Figura 7.C). Para profundizar en este aspecto, se analizaron con más detalle las mitocondrias de ambos cultivos infectados, tomando muestras de cultivos de células Sf9 infectadas con los citados vectores a baja MOI (0,1 pfu/célula) a las 48 hpi para visualizarlos por medio de técnicas de ME, cuyos ejemplos representativos están mostrados en la Figura 8. A este tiempo post-infección, en el que no se encontraron diferencias significativas ni a nivel de recuento de la viabilidad (Figura 7.A) ni a nivel de actividad mitocondrial (Figura 7.C) entre los cultivos infectados con uno u otro vector, no obstante, se pudieron observar diferencias en la morfología de sus mitocondrias. En los campos analizados procedentes de las células infectadas con el vector Convencional, las mitocondrias presentaron generalmente una morfología abultada, redondeada, con una matriz menos densa y unas crestas mitocondriales menos definidas (Figura 8, Convencional). Por el contrario, en los campos pertenecientes a la muestra infectada con el vector TB, se constató un patrón repetitivo de morfología mitocondrial más definida, con una matriz densa, en el que las crestas mitocondriales podían reconocerse con facilidad (Figura 8, TB).

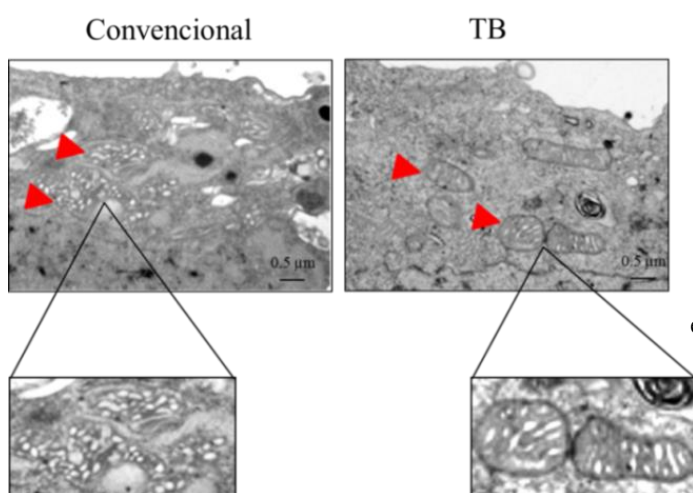


Figura 8: Caracterización de la integridad mitocondrial a través estudios ultraestructurales (ME) de cultivos infectados con los vectores Convencional y TB. Imágenes representativas y en detalle de mitocondrias a las 48 hpi en células Sf9 infectadas con el vector TB (panel derecho) respecto a aquellas infectadas con el vector Convencional (panel izquierdo), donde se observan estructuras mitocondriales más afectadas estructuralmente.

La integridad y la estabilidad de las mitocondrias están estrechamente relacionadas con la activación de la apoptosis celular mediante la liberación del citocromo C en algunos organismos. Por ello, quisimos analizar la integridad mitocondrial a tiempos tempranos a través del estudio de la

liberación del citocromo C al citoplasma en los cultivos infectados con el vector TB respecto los infectados con el vector Convencional (Figura 9). Con este objetivo, se realizaron técnicas de inmunofluorescencia para detectar la señal de co-localización del citocromo C con las mitocondrias en células Sf21 infectadas a alta MOI con los vectores Convencional y TB (Figura 9.A), habiendo realizado dicho procedimiento previamente en células control no infectadas donde la colocación era prácticamente total (datos no mostrados). Al observar microscópicamente las preparaciones pudimos observar como la co-localización de las señales mitocondrial y de citocromo C se mantenía en las células infectadas con el vector TB a las 12 hpi, recordando a lo observado en las células control y en otros trabajos. Sin embargo, al mismo tiempo analizado, las células infectadas con el vector Convencional no mostraron co-localización (Figura 9.A).

Como complementación a este ensayo, se analizó la presencia del citocromo C en las mitocondrias, a través del estudio de fracciones subcelulares que contenían el citosol y los orgánulos de membrana ligera (fracción ligera) y las mitocondrias y las estructuras de doble membrana (fracción pesada) (Figura 9.B). En primer lugar, se constató que en nuestros cultivos de células Sf9 la adaptación del protocolo seleccionado funcionaba (Apartado 12, sección Materiales y Métodos) y nos permitía observar la diferencia entre la presencia de citocromo C liberado al citosol o retenido en mitocondria (datos no mostrados). Una vez infectadas las células Sf9 en suspensión a baja MOI con los vectores Convencional y TB, se procedió a su recolección y separación de las fracciones celulares a las 12 hpi. Las muestras de cada infección fueron analizadas por electroforesis y transferidas a una membrana para posteriormente ser inmunomarcadas frente a citocromo C. Se detectó que en el caso del cultivo celular infectado con el vector TB, la presencia de citocromo C en el citosol era menor a la observada para la muestra procedente de la infección con el vector Convencional (Figura 9.B, Panel Fracción citosólica y membranas ligeras). En consonancia con esta observación, al estudiar la fracción mitocondrial procedente de ambos cultivos infectados se constató el fenómeno inverso con una mayor señal inmuno-específica de citocromo C en la muestra perteneciente a los cultivos infectados con el vector TB respecto a la detectada en la muestra procedente de la infección con el vector Convencional.

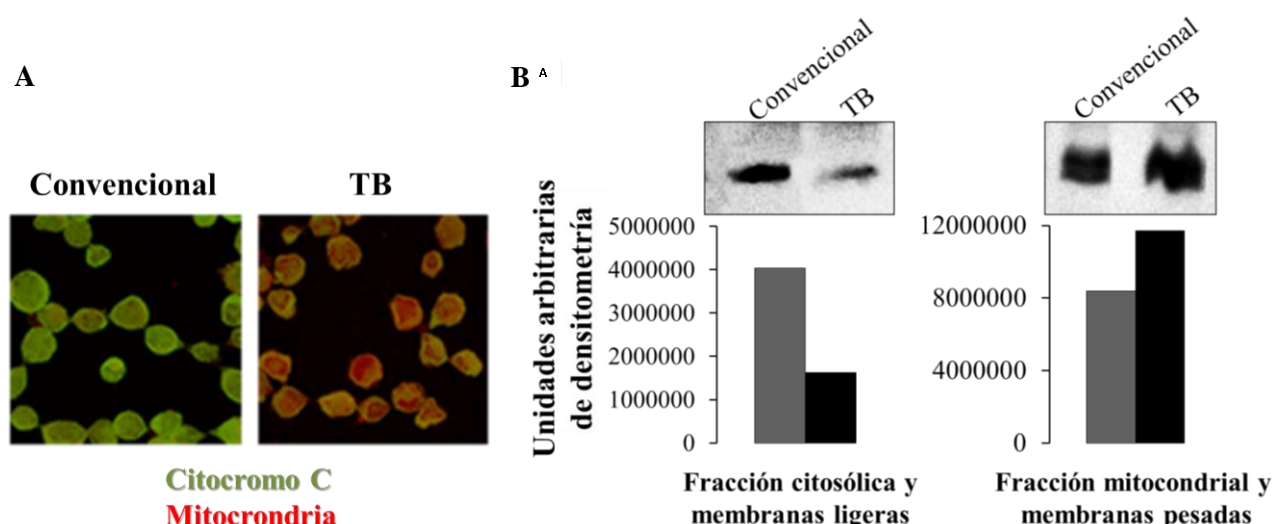


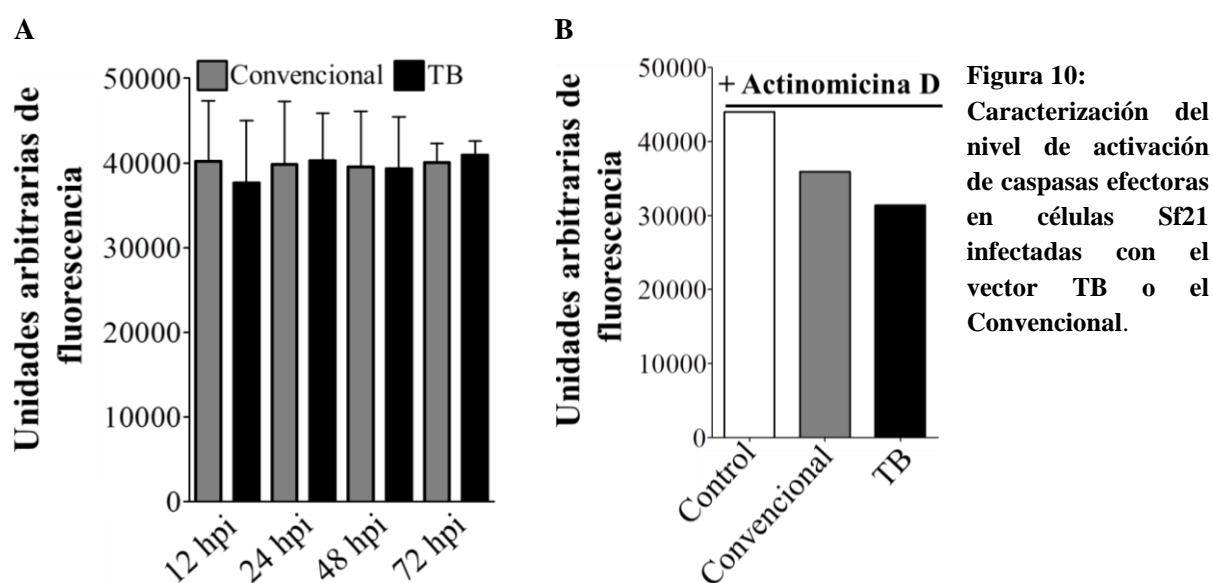
Figura 9: Caracterización de la integridad mitocondrial mediante el estudio de la liberación y retención del citocromo C en mitocondria. A) Inmunofluorescencias de doble marcaje para mitocondria (rojo) y citocromo C (verde) para analizar la retención en mitocondria del citocromo C en células Sf21 infectadas a alta MOI con los vectores Convencional y TB (12 hpi). B) Determinación del patrón de liberación del citocromo C al citosol (fracción ligera) o de retención del mismo en mitocondria (fracción pesada) a través de la inmunodetección por WB del citocromo C en fracciones subcelulares de células Sf9 infectadas a baja MOI con el vector Convencional respecto a las infectadas por el vector TB (12 hpi). El panel inferior representa el valor de densitometría relativo de la banda detectada en el extracto procedente de la infección con el vector Convencional (barras grises) y con el vector TB (barras negras) para cada fracción subcelular.

2.3. Estudio comparativo de la activación de la apoptosis en su fase efectora en cultivos de insecto infectados con el vector TB respecto de los infectados con el vector Convencional.

2.3.1 Caracterización de la cinética de activación de caspasas efectoras (*Sf*-caspasa-1)

La liberación del citocromo C es uno de los eventos clave en la activación de la vía intrínseca de apoptosis en mamíferos. En experimentos anteriores, habíamos observado un patrón temporal retardado en cuanto a su liberación de la mitocondria en el caso de los cultivos infectados con el vector TB. Por tanto, el siguiente paso en este trabajo de Tesis fue el estudio del estado de activación de la ruta apoptótica en su fase efectora (Figura 10 y S-8). En primer lugar, se caracterizó la cinética de activación de las caspasas efectoras en extractos proteicos de células Sf21, para lo cual se realizó una cinética de activación control con una droga inductora de apoptosis (actinomicina D) (Figura S-8.A). Aunque a tiempos finales del tratamiento los extractos proteicos de las células control mostraron un ligero aumento de actividad caspasa efectora, esta actividad se mostró siempre por debajo de los valores de activación mostrados por los extractos del cultivo tratado con la droga inductora. Habiendo confirmado que los extractos proteicos de células Sf21 apoptóticas reaccionaban a la inducción de apoptosis y el sustrato utilizado, se realizó un ensayo de cinética de activación de caspasa efectora en este tipo celular de la infección a alta MOI con el vector Convencional (Figura S-8.B). En este ensayo se pudo constatar cómo las células control repitieron el patrón de activación de caspasas efectoras, mostrando algo de actividad a los tiempos finales de recogida de la muestras. A los mismos tiempos, las células infectadas mantuvieron

practicamente constante y bloqueada la señal de activación de caspasas efectoras en comparación con el cultivo control. Posteriormente, al estudiar en detalle la cinética de activación de caspasas efectoras en infecciones a alta MOI de células Sf21 con los vectores Convencional y TB, no se observaron diferencias significativas a ninguno de los tiempos muestreados (Figura 10.A), aunque se detectó un recurrente y ligero aumento de actividad caspasa efectora a las 12 hpi en las muestras infectadas con el vector Convencional. Por ello, se diseñó un experimento con objeto de poder magnificar dicha diferencia a través del estrés de los sistemas celulares infectados con el tratamiento adicional con actinomicina D (Figura 10.B). De esta manera, se pudo constatar cómo a las 12 hpi, momento en el que las células Sf 21 sin infectar pero apoptóticas tras el tratamiento con la droga inductora mostraban ya actividad caspasa efectora, las células infectadas con el vector Convencional mostraban una inhibición leve de la activación provocada por el estrés con la droga inductora, como se había descrito previamente. Por otro lado, las células infectadas con el vector TB mostraban niveles mayores de inhibición, reflejados en el menor valor de activación de caspasas efectoras representado entre las tres muestras.



A) Comparativa entre las cinéticas de activación de las caspasas efectoras en los extractos proteicos de células infectadas a alta MOI con el vector Convencional (barras grises) o con el vector TB (barras negras) (n=5). B) Representación de la actividad caspasa efectora en las mismas condiciones de infección que en el representado en el panel A pero sometiendo al cultivo a un estrés pro-apoptótico con el tratamiento con actinomicina D. En la figura se observa una mayor inhibición de la actividad caspasa efectora en los extractos procedentes de la infección con el vector TB (barra negra) respecto al valor normal de inhibición en extractos infectados con vector Convencional (barra gris) y a los valores normales de activación de caspasa efectora en células Sf21 tratadas con la droga inductora (Control, barra blanca).

2.3.2. Caracterización de la cinética de activación de caspasas iniciadoras (*Sf-Dronc*)

En las células de insecto las caspasas efectoras son también activadas proteolíticamente a través del procesamiento catalítico llevado a cabo por las caspasas iniciadoras (*Sf-Dronc*). Dadas las diferencias observadas en la activación de caspasas efectoras en condiciones de estrés en los experimentos anteriores, nos cuestionamos si el *efecto protector* observado en las células de insecto infectadas con el vector TB podría estar también relacionado con una menor activación de caspasas iniciadoras (Figura 11). Siguiendo la misma ejecución que en Apartado de Resultados 2.3.1 pero ajustando las horas de muestreo para este tipo de caspasas y adecuando el tipo de sustrato reconocido por las mismas (Apartado 13, Materiales y Métodos), se comprobó la cinética de activación de las caspasas iniciadoras en células Sf21 en respuesta a un estímulo apoptótico, como es el tratamiento con actinomicina D (Figura 11.A). Transcurridas 6 h post-incubación, se observó un aumento de la actividad tipo caspasa iniciadora en aquellos cultivos que habían sido tratados con la droga inductora. Esta actividad siguió aumentando hasta las 12 hpi y se mantuvo constante hasta el final del ensayo (24 hpi). Gracias a estos resultados y a los precedentes del estudio de la cinética de activación de caspasas iniciadoras en células Sf21 infectadas a alta MOI con el vector Convencional (datos no mostrados), se determinó como tiempo de estudio las 12 hpi ya que fue donde se detectó la activación diferencial de estas caspasas en cultivos infectados respecto a los no infectados o los tratados con la droga inductora (Figura 11.A). Seguidamente, se procedió al estudio detallado de este tiempo, comparando la actividad caspasa iniciadora de extractos procedentes de cultivos no infectados, cultivos infectados a alta MOI con el vector Convencional o TB (Figura 11.B). De esta manera, se observó que mientras que no se encontraron diferencias significativas entre la actividad caspasa iniciadora de los extractos procedentes de las células control y las infectadas con el vector TB, la actividad caspasa iniciadora mostrada por los extractos infectados con el vector Convencional fue significativamente mayor a la observada en las otras dos muestras.

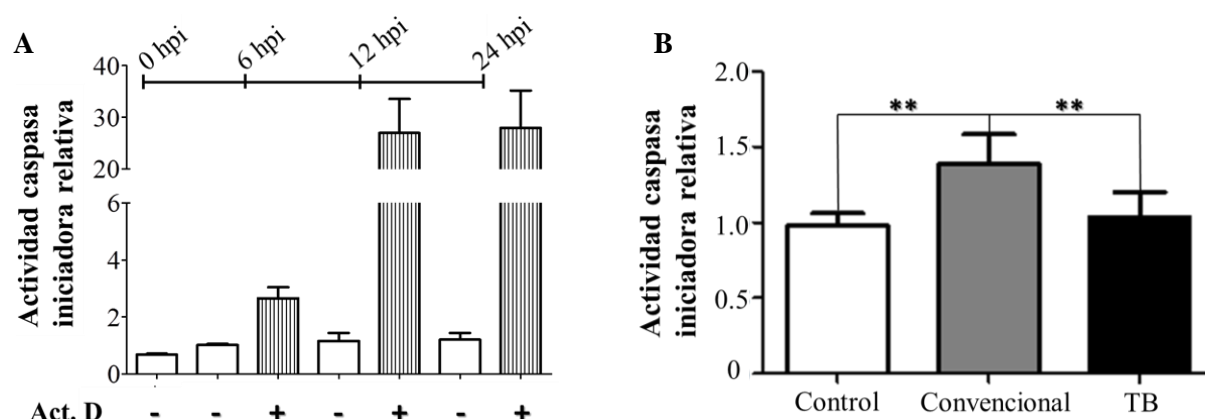


Figura 11: Caracterización de la activación de caspasas iniciadoras en células Sf21 infectadas a alta MOI con el vector TB respecto a infecciones con el vector Convencional. A) Cinética de activación de caspasa iniciadora en extractos de células Sf21 bajo la acción de la droga pro-apoptótica actinomicina D (Act.D, barras rayadas, +) frente a la actividad mostrada por extractos de un cultivo control (barras blancas, -), expresada en relación a la actividad mostrada por extractos del cultivo a tiempo 0 h (n=3). B) Estudio de la actividad caspasa iniciadora a las

12 hpi en células control no infectadas (barra blanca), células infectadas a alta MOI con el vector Convencional (barra gris) o con el vector TB (barra negra), expresada en relación a la actividad caspasa iniciadora de los extractos de las células no infectadas (Control, barra blanca) (n=3). Los asteriscos muestran la significancia estadística (**p-valor < 0,01).

2.4. Agentes responsables del *efecto protector* celular en infecciones con el vector TB

2.4.1. Estudio de la implicación de la proteína anti-apoptótica P35

Los baculovirus han sido ampliamente estudiados debido a los diversos mecanismos que presentan para la evasión de la apoptosis. De entre las diferentes proteínas con función anti-apoptótica descritas en baculovirus, nos centramos en el estudio de la expresión de la proteína *Ac-P35* ya que es el principal inhibidor de apoptosis en el virus *AcMNPV*, base genómica de nuestros vectores recombinantes. Para poder estudiar si existían diferencias en la expresión de la proteína anti-apoptótica P35 que pudiesen explicar el *efecto protector* celular asociado a las infecciones con el vector TB respecto a las llevadas a cabo con el vector Convencional, se infectaron células Sf21 a una MOI de 1 pfu/célula y sus extractos proteicos totales fueron separados electroforéticamente para detectar la cantidad de *Ac-P35* que había en ellos por medio de inmunodetección específica (Figura 12). Debido a la naturaleza temprana y tardía del promotor que regula su expresión, la proteína *Ac-P35* fue detectada a lo largo de todo el curso de la infección (6-72 hpi) como una banda específica en los extractos infectados, ausente en las células Sf21 control (no infectadas). En lo referente a la comparativa de su expresión entre los extractos proteicos, no se observaron diferencias en la cantidad de proteína *Ac-P35* expresada entre el extracto procedente de la infección con el vector Convencional y el de la infección con el vector TB, no pudiendo correlacionar la cantidad de la proteína *Ac-P35* detectada con el retardo en la aparición del CPE descrito anteriormente.

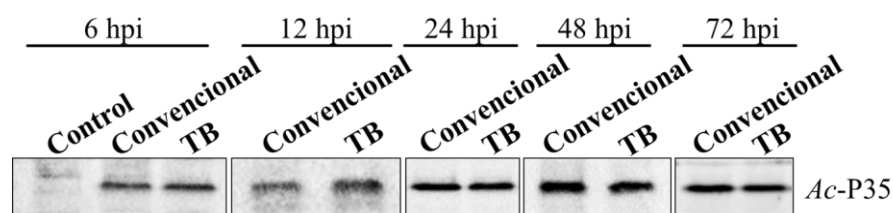


Figura 12: Cinética de expresión de la proteína *Ac-P35* en extractos proteicos de células Sf21 infectadas. Los cultivos celulares se infectaron a una MOI de 1 pfu con el vector Convencional o el vector TB y los extractos proteicos totales recogidos a diferentes tiempos (20 µg TP/carril) se analizaron por inmunodetección frente a la proteína *Ac-P35*. También se analizó paralelamente la misma cantidad de extracto proteico total procedente de células sin infectar (muestra Control).

2.4.2. Estudio de la implicación de otras proteínas anti-apoptóticas en la infección con el vector TB relacionadas con su *efecto protector* en células de insecto.

En vista del anterior resultado, decidimos estudiar la expresión a nivel transcripcional de otros genes anti-apoptóticos, tanto del propio virus como de la célula huésped, que pudiesen estar relacionados con el *efecto protector* celular del vector TB en el contexto de la infección. Para ello, se realizaron infecciones a alta MOI en células Sf21 con el vector Convencional o el vector TB y posteriormente, se recogieron las muestras a las 18 hpi para extraer su contenido de ARN total y analizar la expresión a nivel transcripcional de otros dos genes anti-apoptóticos seleccionados *Ac-iap* y *Sf-iap* (Figura 13). Además, se analizó la transcripción del ARN ribosómico 28S de *S. frugiperda* (*Sf-28S rARN*) como control interno de carga de ARN total. Como control de la infección de los cultivos, se analizó la transcripción del ARN de la glicoproteína de la envuelta del baculovirus (*Ac-gp64*). En primer lugar, se constató que la carga de ARN total era similar para todas las muestras (células no infectadas e infectadas), gracias a la detección de la misma intensidad de señal para la banda específica del *rARN Sf-28S* (Figura 13, *Sf-28S rARN*). Seguidamente, se determinó que la consecución de la infección fue similar en términos de expresión de *Ac-gp64*, ya que se detectó una intensidad de banda similar en los análisis realizados con el ARN procedente de las infecciones con el vector Convencional y el vector TB, mientras que hubo ausencia de señal en la muestra no infectada (Figura 13, Panel *Ac-gp64*). En lo referente a los genes anti-apoptóticos, se observó un patrón transcripcional diferencial para los genes *Ac-iap* y *Sf-iap*. La señal obtenida para el gen *Ac-iap* en las muestras infectadas con sendos vectores fue similar para las muestras de ARN totales de ambas infecciones y, específica de éstas ya que se halló ausente en la muestra no infectada (Figura 13 Panel *Ac-iap*). De manera contraria, se detectó una ausencia prácticamente total de señal del gen *Sf-iap* en la muestra procedente de la infección con el vector Convencional, mientras que en las muestras de células control y las infectadas con el vector TB, sí se detectó transcripción de este gen (Figura 13, Panel *Sf-iap*).

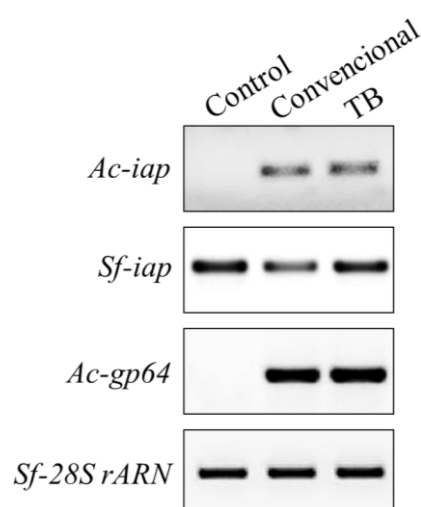


Figura 13: Estudio a nivel transcripcional (RT-PCR) de la expresión de los genes anti-apoptóticos vírico (*Ac-iap*) y celular (*Sf-iap*) como potenciales responsables del efecto protector celular de los baculovirus TB. Se infectaron cultivos de células Sf21 a alta MOI con los vectores Convencional o TB y se analizó la transcripción de los genes citados anteriormente a las 18 hpi. En la figura se observan diferencias a nivel transcripcional para el gen celular *Sf-iap*. Se utilizó como control de las reacciones RT-PCR el mARN codificado por el gen *Ac-gp64* (control de infección), *Sf-28S rARN* (control de carga) y todas las reacciones anteriores con ARN total de células no infectadas (Control).

En vista de este resultado, se planificó un estudio más detallado del análisis de la transcripción del gen *Sf-iap* en células Sf21 infectadas a alta MOI con los vectores Convencional y TB respectivamente (Figura 14). En ambas muestras infectadas se detectó una ralentización en su expresión a nivel transcripcional respecto a la mostrada en células no infectadas (Figura 14.A). Sin embargo, esta disminución de la transcripción fue algo más temprana, marcada y sostenida durante los tiempos muestreados en aquellas muestras obtenidas de células infectadas con el vector Convencional respecto a las infectadas con el vector TB. De hecho, al analizar en detalle el momento de la infección en el que otros autores han definido como inicio general del apagado génico en la célula infectada por baculovirus (18 hpi), se encontraron diferencias significativas entre la transcripción detectada en la muestras control de células y en las de estas infectadas con el vector TB con respecto a la mostrada por las que provenían de células infectadas por el vector Convencional (Figura 14.B).

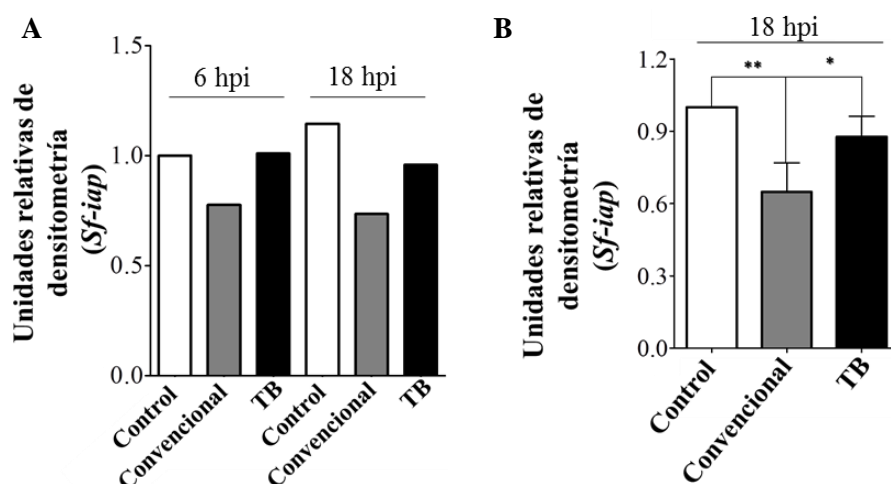


Figura 14: Estudio de la transcripción del gen *Sf-iap* en células Sf21 infectadas a alta MOI con el vector Convencional o el vector TB.

A) Estudio del patrón de la transcripción de *Sf-iap* en muestras no infectadas respecto a las infectadas con el vector Convencional o el vector TB, representado por la densitometría relativa de las bandas obtenidas para *Sf-iap* respecto a la expresión de *Sf-28S rARN* de cada muestra para las células no infectadas (Control, barras blancas) y las infectadas con los vectores Convencional (grises) y TB (negras) durante el transcurso del ensayo. Se aprecia una ralentización de la transcripción más temprana y más acusada respecto a las células control en la muestra infectada con el vector Convencional. B) Estudio estadístico de la parada transcripcional del gen *Sf-iap* a las 18 hpi en células Sf21 infectadas en las mismas condiciones que en el apartado A, representado por la expresión relativa en relación a la expresión en las células control y a la expresión de *Sf-28S rARN* de cada muestra (n=3). Los asteriscos denotan las diferencias significativas (** p-valor < 0,01, * p-valor < 0,05).

2.4.3. Estudio del efecto de la infección del vector TB sobre la transcripción de otros genes de la célula huésped.

Los resultados obtenidos sobre la transcripción del gen *Sf-iap* nos hizo plantearnos si la infección con el vector TB ejercía directamente un efecto sobre la transcripción de este gen anti-apoptótico en concreto o, si bien, lo haría sobre otros genes de la célula huésped infectada para los que se

ha descrito previamente de apagado génico tras la infección con un vector baculovirus convencional. Con este objetivo, células Sf21 fueron infectadas a alta MOI con los vectores Convencional o TB y su contenido de ARN total fue extraído a diferentes tiempos post-infección para proceder al análisis de la expresión del *gen receptor KDEL tipo 2A* de la célula huésped a través de RT-PCR, uno de los principales genes afectados por el apagado génico celular durante la infección con baculovirus (Figura 15). Al analizar el ratio de inhibición de la expresión de este gen respecto a la expresión que presentan células Sf21 sin infectar, se observó una tendencia al incremento de la inhibición en los cultivos infectados (independientemente del vector empleado en la infección) conforme transcurrió la infección y alcanzando el pico máximo de inhibición observado a las 48 hpi. Sin embargo, en las muestras procedentes de la infección con el vector TB se observó un retardo en el cese de la transcripción del *gen receptor de KDEL tipo 2A* (Figura 15). Los datos descritos en los Apartados de Resultados 2.1-2.3 sugerían entonces una posible relación entre el retardo del CPE y de la apoptosis con un retraso del efecto de parada de biosíntesis proteica en los cultivos infectados con el vector TB respecto a las infecciones con el vector Convencional.

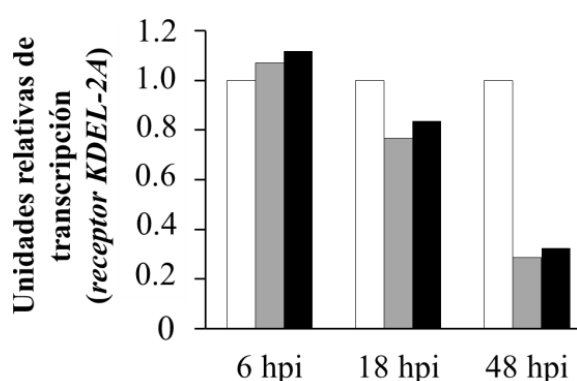


Figura 15: Estudio de la transcripción del gen del receptor de KDEL tipo 2A. Se representa su nivel de transcripción en relación a la del gen control (*Sf-28S rARN*) en células Sf21 infectadas a alta MOI con el vector Convencional (barras gris) o el vector TB (barras negras) respecto a células control no infectadas (barras blancas).

3. Efecto de la infección del vector TB sobre células de insecto a nivel de activación de rutas de proliferación y supervivencia celular

3.1. Cinética de crecimiento poblacional en cultivos infectados con el vector TB

Como ya está descrito por experimentos previos de nuestro grupo, durante la producción de proteínas de interés en cultivos de células Sf9 en suspensión, se puso de manifiesto un comportamiento diferencial entre aquellos cultivos que eran infectados con un vector TB o un vector Convencional portadores del gen de interés en cada caso. Nos propusimos comprobar si la infección con el vector TB podía también ejercer efectos a nivel de activación de rutas de proliferación y supervivencia celular (Figura 16). El estudio del recuento de nº de células viables en los cultivos infectados con el vector Convencional y con el vector TB a través de la tinción excluyente con azul trypan dió como resultado que desde las 6 hpi, se observaba una tendencia al incremento del número de células viables de hasta un 10 % en el cultivo infectado con el vector TB respecto del infectado con el vector Convencional. Esta

diferencia en el número viable de células fue aumentando de tal manera que, a las 24 y 48 hpi, el número de células viables en los cultivos infectados con el vector TB fue significativamente mayor que el observado en las infecciones con el vector Convencional (Figura 16.A). Por ello, se analizó si la infección con el vector TB ejercía una mayor activación de la ruta de proliferación y supervivencia celular regulada por la proteína Akt, la cual *per se* se ha descrito que es activada por los baculovirus en las células de insecto infectadas (Figura 16.B). Con este objetivo, se realizaron infecciones a alta MOI en células Sf21 con los vectores Convencional o TB y se recogieron las muestras para resolver los extractos proteicos totales y proceder a la inmunodetección de la forma activada de la proteína Akt. A las 2 hpi pudimos observar cómo, para misma expresión de Akt total en los extractos procedentes de ambas infecciones (Figura S-9), se detectaba mayor cantidad de Akt en su forma activada en los extractos procedentes de la infección con el vector TB (Figura 16.B y S-9). Este resultado sugería que el vector TB también pudiese estar ejerciendo una mayor activación de la ruta de proliferación y supervivencia en la que participa Akt y que, en conjunción con el resto de fenómenos descritos en este trabajo de Tesis, podría estar colaborando en el retardo de la aparición del CPE a modo de *efecto protector* sobre las células de insecto infectadas.

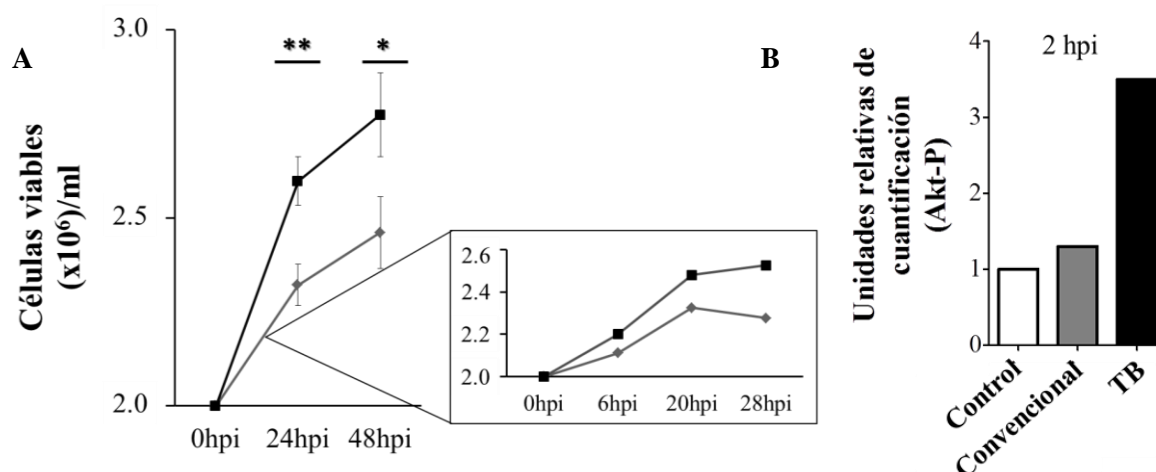


Figura 16: Caracterización del número de células viables en cultivos infectados con un vector TB o uno Convencional. A) Monitorización del número de células viables por ml (tinción con azul trypan) en cultivos de células Sf9 en suspensión infectados a baja MOI, en la que se detecta un mayor número de células viables en el cultivo infectado con el vector TB (■) respecto al cultivo infectado con el vector Convencional (◆) (n=3). Los asteriscos denotan las diferencias significativas encontradas (** p-valor < 0,01; * p-valor < 0,05). B) Cuantificación relativa de la proteína Akt activa (*formas fosforiladas, Figura S-9) detectada por WB en células Sf21 infectadas a alta MOI con el vector Convencional (barra gris) o TB (barra negra) frente a células no infectadas (Control, barra blanca) (2 hpi).

4. Caracterización del papel que juegan cada uno de los transactivadores para los que codifica el cADN *Ac-ie-01* en infecciones con el vector TB

Una vez caracterizados los efectos que ejerce la infección con el vector TB en células de insecto respecto a las infectadas con el vector Convencional, se planteó la posibilidad de estudiar más en detalle la implicación individual de los dos factores transactivadores codificados bajo la secuencia *Ac-ie-01*: *Ac-IE0* y *Ac-IE1*. 4.1. Caracterización de los vectores que sobre-expresan independientemente cada uno de los dos transactivadores codificados por el cADN *Ac-ie-01* Se generaron construcciones alternativas a partir del vector TB en las que se sustituyó la secuencia *Ac-ie-01* por sus versiones *Ac-ie-01I* (sólo se sobre-expresa la proteína *Ac-IE0*, vector TB-B) y *Ac-ie-1* (sólo se sobre-expresa la proteína *Ac-IE1*, vector TB-C) (Figura S-10). Una vez generadas, se obtuvieron los correspondientes baculovirus recombinantes y se caracterizó la sobre-expresión de cada uno de los factores en infecciones de células Sf21 a una MOI de 1 pfu a través del inmunomarcaje específico de *Ac-IE0* e *IE-1* en los extractos proteicos totales recogidos a los distintos tiempos post-infección (Figura 17). A tiempos tempranos de la infección (6-12 hpi), se detectaron los mismos niveles de expresión de *Ac-IE0* y *Ac-IE1* (Figura 17.A) como resultado de la expresión basal llevada a cabo por sus promotores naturales presentes en el genoma del baculovirus (copia original de los genes) ya que el promotor que rige la sobre-expresión de estos factores en la copia adicional es un promotor del baculovirus de actividad muy tardía (el promotor *polh*) y no funcional a tiempos tempranos de la infección (6-12 hpi). A partir de las 24 hpi se observó cómo dicho patrón de expresión en los extractos procedentes de las infecciones con los vectores TB-B y TB-C cambió respecto al mostrado por los provenientes de la infección con el vector Convencional, y lo mismo ocurrió en el caso del vector TB (Figura 17.B), como ya se había observado previamente (Figura 5.B y Apartado 1, sección Resultados). El análisis de las muestras infectadas con el vector Convencional apenas mostró expresión de la proteína *Ac-IE0* mientras que la proteína *Ac-IE1* sí fue detectable hasta las 48 hpi. En los extractos procedentes de la infección con los vectores TB y TB-B, se detectó una expresión creciente de *Ac-IE0* y sostenida para *Ac-IE1* a partir de las 24 hpi. En los procedentes de la infección con el vector TB-C, se detectó un aumento de la cantidad de *Ac-IE1* mientras que para la expresión de *Ac-IE0* se observó un patrón similar al detectado en los extractos provenientes de la infección con el vector Convencional.

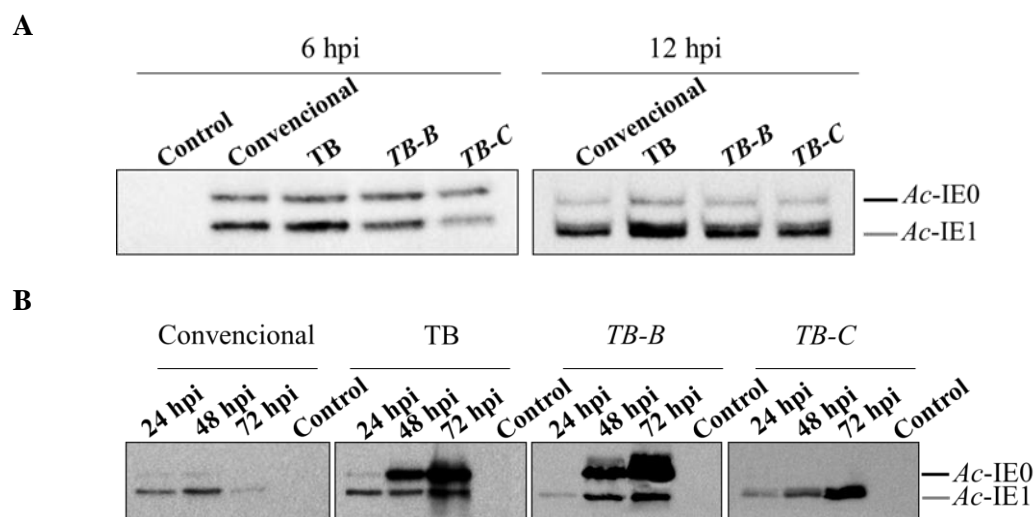


Figura 17: Caracterización de la cinética de sobre-expresión de las secuencias *Ac-ie-0A1* (TB-B) y *Ac-ie-1* (TB-C) respecto a *Ac-ie-0I* (TB). Se infectaron células Sf21 (MOI de 1 pfu) con el vector Convencional, el vector TB o con cada una de sus versiones (TB-B, TB-C) y se procedió a la inmunodetección de las proteínas *Ac-IE0* y *Ac-IE1* en extractos proteicos totales procedentes de muestras recogidas a A) Tiempos tempranos de la infección (6 y 12 hpi); B) Tiempos tardíos (24-72 hpi). En A las muestras se cargaron en los geles a una concentración de 20 µg/carril y en B la muestras cargadas se homogenizaron por el volumen mínimo para la óptima distinción de los factores transactivadores). En los apartados A y B, se emplea la muestra Control se corresponde con extracto procedente de las células sin infectar y se carga de manera equivalente al resto de muestras.

Aunque previamente habíamos constatado que no existían diferencias a nivel de producción de progenie vírica entre los vectores Convencional y TB (Figura 6), se quiso comprobar, no obstante, si la sobre-expresión de los factores transactivadores por separado ejercía algún efecto en la replicación vírica (Figura 18). De nuevo, se analizó el patrón de expresión de la glicoproteína vírica de envuelta *Ac-GP64* en cultivos en monocapa de células Sf21 infectadas a una MOI de 1 pfu/célula con el vector Convencional o con los vectores TB, TB-B y TB-C (Figura 18.A). Se analizaron los extractos totales proteicos de cada una de las muestras recogidas en los tiempos comprendidos entre las 6 y las 72 hpi para detección inmuno-específica de la proteína *Ac-GP64* en comparación con la muestra infectada con el vector Convencional. En ninguno de los casos, la sobre-expresión de uno o los dos factores transactivadores produjo diferencias en la expresión de la proteína *Ac-GP64*. Además, los medios extracelulares de las muestras recogidas a las 72 hpi fueron titulados por triplicado para dilucidar si la sobre-expresión de uno o los dos transactivadores en el contexto vírico podría incrementar de alguna manera el título de partículas víricas infectivas, pero no se encontraron diferencias significativas en ningún caso (Figura 18.B).

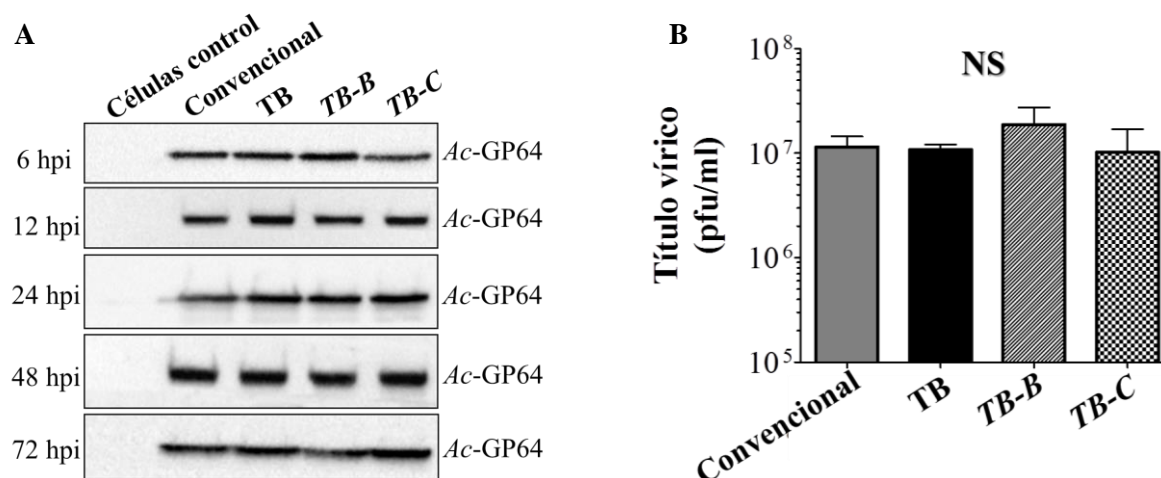


Figura 18: Caracterización del efecto de la sobre-expresión de las proteínas *Ac-IE0* y *Ac-IE1*, en el vector TB y sus dos variantes TB-B y TB-C, en la producción de progenie vírica. A) Cinética de expresión de la glicoproteína de envuelta vírica *Ac-GP64* analizada mediante su inmunodetección específica en extractos proteicos de células Sf21 infectadas con cada vector (MOI=1). B) Titulación de los medios extracelulares de las infecciones citadas en el apartado anterior de esta figura (tiempo de recogida: 72 hpi) (n=3).

4.2. Caracterización del efecto protector celular en infecciones con los vectores TB-B y TB-C

En el Apartado 2.1. de Resultados, se describen detalladamente los resultados obtenidos en lo referente al estudio del *efecto protector* en los cultivos infectados con el vector TB respecto a aquellos infectados con el vector Convencional. Con el objeto de poder discernir la implicación de los dos factores transactivadores codificados por el cADN de *Ac-ie-01* en la ejecución de dicho efecto, se realizaron estudios de recuento celular y de análisis de la viabilidad de cultivos de células Sf9 en suspensión infectadas con las construcciones que sobre-expresaban uno sólo de los transactivadores (TB-B, TB-C) respecto a las infecciones con el vector Convencional y el vector TB (Figura 19). Cultivos de células Sf9 en suspensión fueron infectados a una MOI de 0,1 pfu/célula y su viabilidad fue monitorizada, a través de la tinción excluyente con azul trypan, durante la infección. A tiempos tardíos de la infección (72-120 hpi), se pudo observar nuevamente un notorio CPE inducido por la replicación vírica del vector Convencional en los cultivos infectados, reflejado en forma de menores porcentajes de viabilidad celular respecto al resto de cultivos infectados con los otros vectores (Figura 19.A). A partir de las 72 hpi y hasta la finalización de los ensayos, los porcentajes de viabilidad de los cultivos infectados con los vectores TB, TB-B y TB-C fueron significativamente mayores frente a los registrados por los cultivos infectados por el vector Convencional.

Como ya se había realizado durante el estudio comparativo de la viabilidad entre las infecciones con el vector Convencional y el vector TB, se quiso confirmar este resultado a través de la prueba bioquímica de actividad reductora mitocondrial. Para ello, células Sf21 en monocapa fueron infectadas a

una MOI de 5 pfu/célula con los vectores Convencional, TB, TB-B o TB-C y se procedió a la determinación indirecta de su viabilidad mediante esta técnica a los tiempos de 72 y 96 hpi (Figura 19.B). Al igual que se observó para los cultivos en suspensión, se encontraron diferencias significativas en la cantidad de formazán producido a las 72 hpi entre los cultivos infectados por el vector Convencional y los infectados por los vectores TB y TB-B, siendo los niveles relativos de producción de formazán mayores en los cultivos infectados con los vectores TB y TB-B. Hasta las 96 hpi no se encontraron diferencias significativas entre la actividad reductora mitocondrial de los cultivos infectados con el vector Convencional respecto a los infectados con el vector TB-C. En ninguno de los ensayos de viabilidad (Figura 19.A y B) se encontraron diferencias significativas entre los cultivos infectados con los vectores TB, TB-B y TB-C.

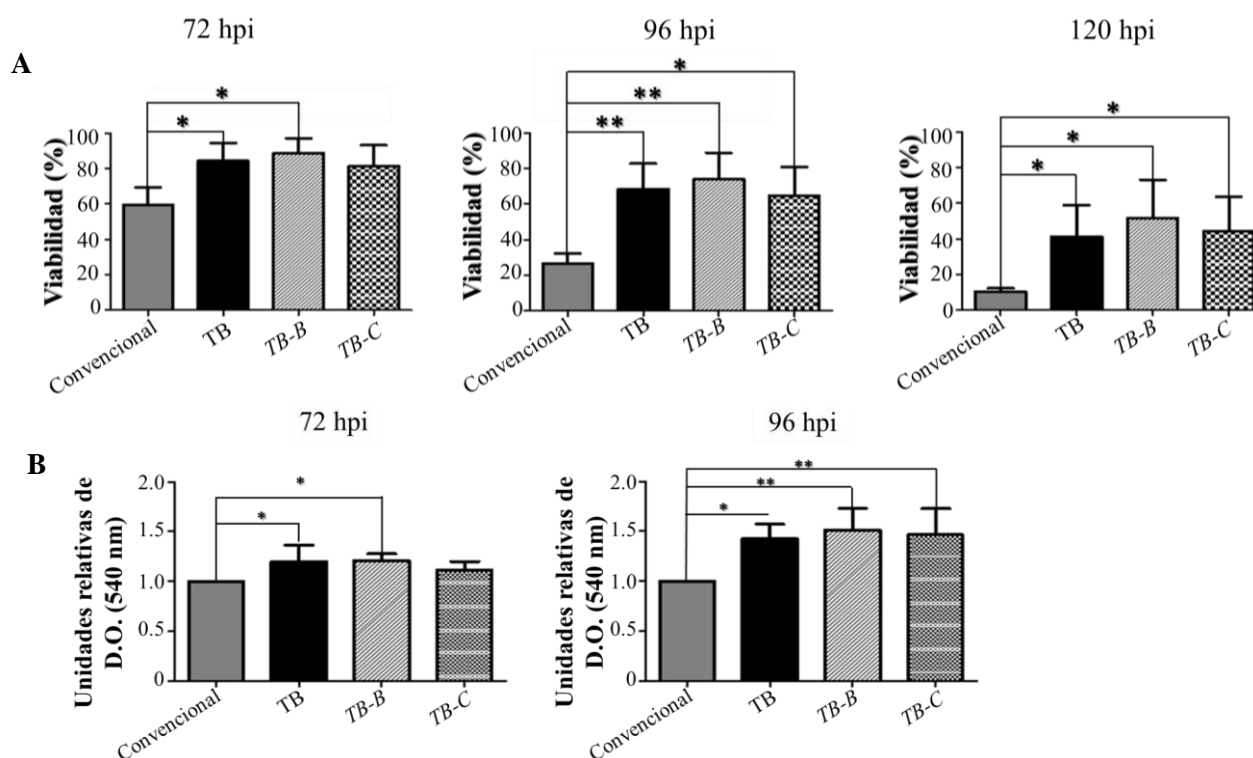


Figura 19: Caracterización del efecto protector a tiempos muy tardíos de la infección (72-120 hpi) con el vector TB y sus versiones derivadas TB-B y TB-C. A) Monitorización de la viabilidad de cultivos Sf9 infectados a baja MOI con los vectores Convencional (barras gris), TB (barras negras), TB-B (barras con líneas diagonales) o TB-C (barras con damero), por tinción con azul trypan (n=3). B) Determinación indirecta de la viabilidad de células Sf21 infectadas a alta MOI con los vectores citados en el Apartado A, a través de la actividad reductora mitocondrial de MTS a formazán, relativizada a la actividad presente en los cultivos infectados con el vector Convencional (n=5). Los asteriscos denotan las diferencias significativas (* p-valor < 0,05; ** p-valor < 0,01).

4.3. Cinética de crecimiento poblacional en cultivos infectados con los vectores TB-B y TB-C

Como ya se ha descrito con anterioridad, en nuestro modelo de ensayo en cultivos de Sf9 en suspensión infectados a baja MOI, las células infectadas con el vector TB mostraron un retardo respecto a la parada de actividad biológica de la célula huésped y una potencial mayor activación de rutas de proliferación y supervivencia respecto a aquellos cultivos infectados con el vector Convencional (Apartados 2.2 y 2.4, Resultados). Pese a que no se observaron diferencias a nivel de viabilidad de los cultivos infectados con los vectores TB, TB-B y TB-C, se quiso constatar si podrían existir diferencias a nivel de activación de rutas de proliferación y supervivencia en el modelo de sobre-expresión de los dos factores transactivadores por separado. Con este objetivo, se infectaron células Sf9 en suspensión a una MOI de 0,1 pfu con los vectores Convencional, TB, TB-B y TB-C y se realizaron contajes del número de células viables a través de la tinción excluyente con azul trypan analizando tiempos más tempranos que en el apartado anterior (24 y 48 hpi, Figura 20). Con respecto al número de células viables observadas en los cultivos celulares se comprobó que aquellos infectados con los vectores TB y con TB-B fueron significativamente mayores con respecto a aquellos infectados con el vector Convencional (Figura 20.A y B). Por el contrario, ni a las 24 (Figura 20.A) ni a las 48 hpi (Figura 20.B) se encontraron diferencias significativas en el número de células viables en los cultivos infectados con el vector TB-C respecto a los infectados con el vector Convencional. Es interesante resaltar que en lo referente a este fenómeno, sí se detectaron diferencias significativas entre las distintas versiones derivadas del vector TB. A 24 hpi, la diferencia entre la población viable de células infectadas con el vector TB-B fue significativamente mayor que la encontrada en las infecciones con el vector TB-C (Figura 20.A). Además, esta diferencia se tornó incluso más llamativa a las 48 hpi (Figura 20.B). Comparando el número de células viables presentes en los cultivos infectados con el vector TB respecto a las presentes en las infecciones con el vector TB-C, se observó que dicho n° fue significativamente mayor en los cultivos infectados con el vector TB a las 48 hpi (Figura 20.B).

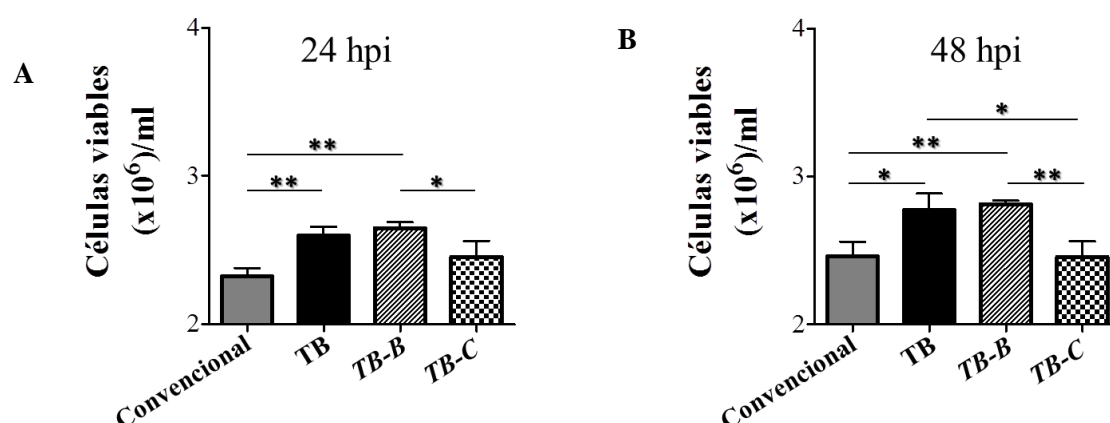


Figura 20: Caracterización del efecto de proliferación en células Sf9 infectadas con el vector TB o sus versiones derivadas TB-B y TB-C. Monitorización a tiempos tardíos de la infección (A- 24 hpi, B- 48 hpi), del número de células viables (tinción excluyente con azul trypan) en cultivos en suspensión de células Sf9 infectados a baja MOI con el vector Convencional (barras grises), TB (barras negras), TB-B (barras con líneas diagonales) y

TB-C (barras con damero) (n=3). Los asteriscos denotan las diferencias significativas (* p-valor 0,05; ** p-valor 0,01).

4.4. Efecto de los vectores TB-B y TB-C a nivel de expresión de una proteína heteróloga modelo en células de insecto infectadas

Para finalizar el estudio comparativo de las versiones del vector TB en las que sólo se sobre-expresó uno de los dos transactivadores codificados por la secuencia *Ac-ie-01*, se procedió a la caracterización de su influencia sobre el resto de los elementos reguladores del vector TB a través del estudio de la producción de una proteína heteróloga modelo. Para ello se utilizó la proteína verde fluorescente (GFP), cuyo gen se incorporó en las diferentes versiones del casete TB y sus correspondientes virus recombinantes generados (Figura S-10). Se realizaron tanto infecciones a baja MOI en cultivos de células Sf9 en suspensión (Figura 21.A) como a alta MOI en cultivos en monocapa de células Sf21 (Figura 21.B) con los vectores Convencional, TB, TB-B y TB-C expresando la proteína GFP. En ambos ensayos, se procedió a la determinación de la funcionalidad de la proteína heteróloga expresada por técnicas de citometría de flujo (Figura 21.A) o fluorimétricas (Figura 21.B). En ambas aproximaciones se observó como todos los vectores recombinantes expresaron la proteína heteróloga funcionalmente correcta ya que para todas las muestras y todos los tiempos recogidos se detectó fluorescencia específica debida a la expresión de la proteína GFP. En el caso del ensayo en cultivos en suspensión (Figura 21.A) se aprecia cómo, debido a la actividad más temprana del promotor que rige la expresión de la proteína GFP en el vector TB y sus dos versiones, desde las 24 hpi se detecta una población de células que emiten máxima fluorescencia para GFP. En comparación con la población de células infectadas con el vector Convencional que emiten en la máxima intensidad de fluorescencia para GFP, cualquiera de las infecciones con las versiones del vector TB presentó mayores porcentajes de poblaciones celulares que emitían para GFP a lo largo de la infección, siendo la versión TB-B la que sutilmente destacaba. A través del análisis fluorimétrico de extractos proteicos totales solubles de células Sf21 infectadas con los citados vectores a alta MOI, se corroboró que a tiempos tardíos (en los que el promotor que rige la expresión de la proteína GFP en el vector Convencional presenta su pico máximo de expresión), cualquiera de los extractos provenientes de las infecciones con el vector TB y sus versiones presentó mayor actividad fluorescente que los procedentes de la infección con el vector Convencional (Figura 21.B). La actividad fluorescente presentada por los extractos proteicos totales solubles procedentes de las infecciones con cualquiera de las versiones del vector TB presentaron unos niveles similares, siendo sutilmente superiores el de la infección con el vector TB-C a las 72 hpi y el de la infección con el vector TB-B a las 96 hpi,. Aunque los extractos proteicos totales solubles procedentes de la infección con el vector Convencional en células Sf21 mostraron actividad fluorescente para GFP a tiempos tardíos de la infección, al ser resueltos en geles de poli-acrilamida e inmunomarcados para la proteína GFP se detectaron formas de movilidad electroforética aberrante (Figura 21.C, GFP). Estas

formas no fueron detectadas en ninguno de los extractos procedentes de las infecciones con el vector TB o sus versiones cuando se procedió a la resolución electroforética de los mismos (Figura 21.C, GFP). Estas formas aberrantes correlacionaron con una menor detección de tubulina intracelular en los extractos procedentes de la infección con el vector Convencional (Figura 21.C, tubulina), mientras que en los provenientes de las infecciones con los vectores TB-B y TB-C, se observó una ligera mayor detección de tubulina tal y como también se había descrito previamente para el vector TB (Figura 7.B).

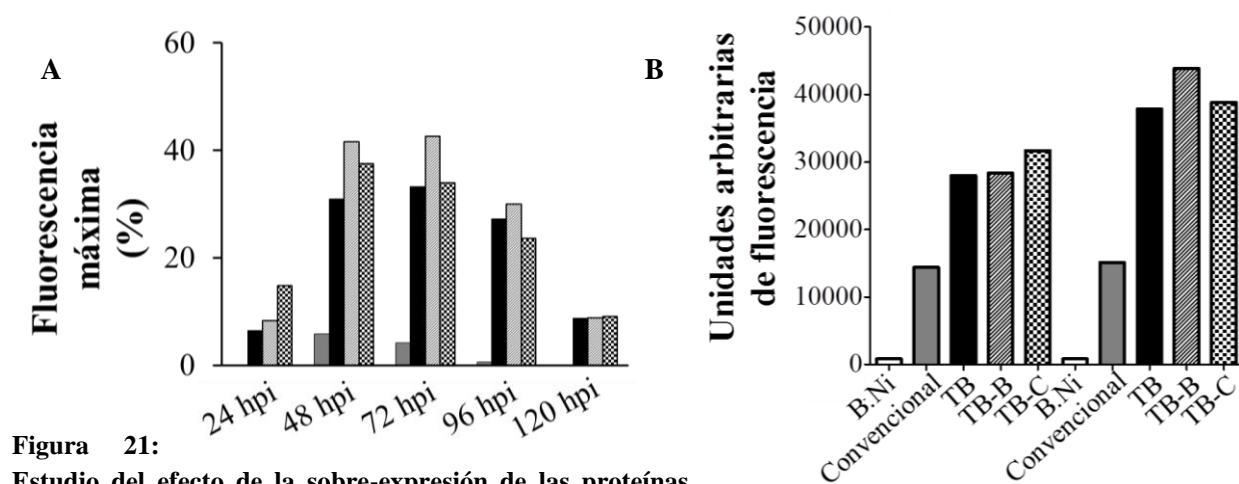
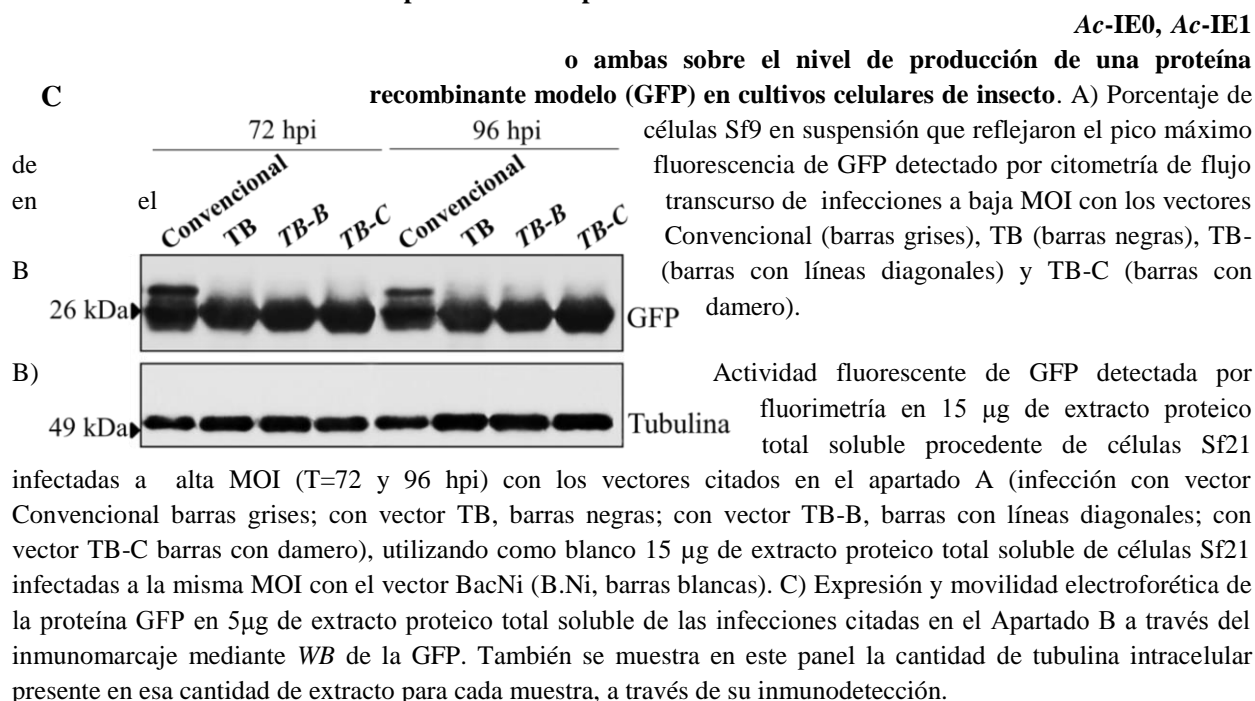


Figura 21:
Estudio del efecto de la sobre-expresión de las proteínas



5. Aplicación de vectores TB para la producción de proteínas de interés vacunal

5.1. Comparación de la expresión y secreción de la proteína HA¹⁸⁻⁵²⁹ mediante infecciones con los vectores Convencional y TB recombinantes

Dadas las propiedades observadas en vectores baculovirus modificados por el casete de expresión TB y caracterizadas en la presente Tesis doctoral, se procedió a comprobar su utilidad en la producción de glicoproteínas de interés vacunal. Se eligió este tipo de proteínas ya que han de sufrir una serie de modificaciones post-traduccionales complejas y en muchos casos, ser secretadas al medio extracelular para su correcta funcionalidad. Sin embargo, para que estos acontecimientos ocurran de manera eficiente en un sistema productivo lítico como el de los vectores baculovirus, la reducción de su característico CPE o, al menos, su retardo resultan críticos. En este contexto, nos planteamos el estudio de la producción-secreción de la glicoproteína hemaglutinina (HA) del virus de la influenza A como modelo de interés vacunal. Se generaron los baculovirus recombinantes que codificaban para la región globular de esta proteína (HA¹⁸⁻⁵²⁹) en conjunción a la adición de un péptido señal de insecto o la señal de retención en ER (Figura S-11, Tabla 1 de sección Materiales y Métodos), junto con de una cola de 6 aa de histidinas.

5.1.1. Producción de la proteína HA¹⁸⁻⁵²⁹ en combinación con el péptido señal de la proteína melitina

Una vez generados los baculovirus recombinantes portadores de la citada construcción, se determinó en primer lugar el tiempo óptimo de expresión y recogida de la proteína recombinante HA¹⁸⁻⁵²⁹ en cultivos de células Sf9 en suspensión. De tal manera que, a través de muestreos de las células viables en los cultivos infectados (Figura 22.A) y de la inmunodetección de la presencia proteínas intracelulares en el medio extracelular (Figura 22.B), se procedió a dilucidar el tiempo óptimo de expresión para cada vector. Gracias a la tinción excluyente con azul trypan, se observó cómo en las infecciones de células Sf9 en suspensión con el vector TB a baja MOI, la viabilidad de los cultivos se mantuvo en porcentajes más altos respecto a los observados en los cultivos infectados en las mismas condiciones con el vector Convencional desde las 72 hpi, llegando a encontrar diferencias significativas en este porcentaje de viabilidad a las 96 hpi (Figura 22.A). Además, correlacionando con estos porcentajes de viabilidad, se constató un retardo en la aparición de la lisis celular en los cultivos infectados con el vector TB (Figura 22.B). Mediante técnicas de detección indirecta (como el inmunomarcaje de la tubulina intracelular en el medio extracelular), se observó un retraso de unas 24h en la aparición de la lisis celular en los cultivos infectados con el vector TB respecto a la aparición de dicho efecto en los infectados con el vector Convencional. Finalmente, los datos recopilados permitieron determinar como tiempos óptimos de producción de HA¹⁸⁻⁵²⁹, en estas condiciones de cultivo, 48 hpi para el vector Convencional, y de 72 hpi para el vector TB (Figura 22).

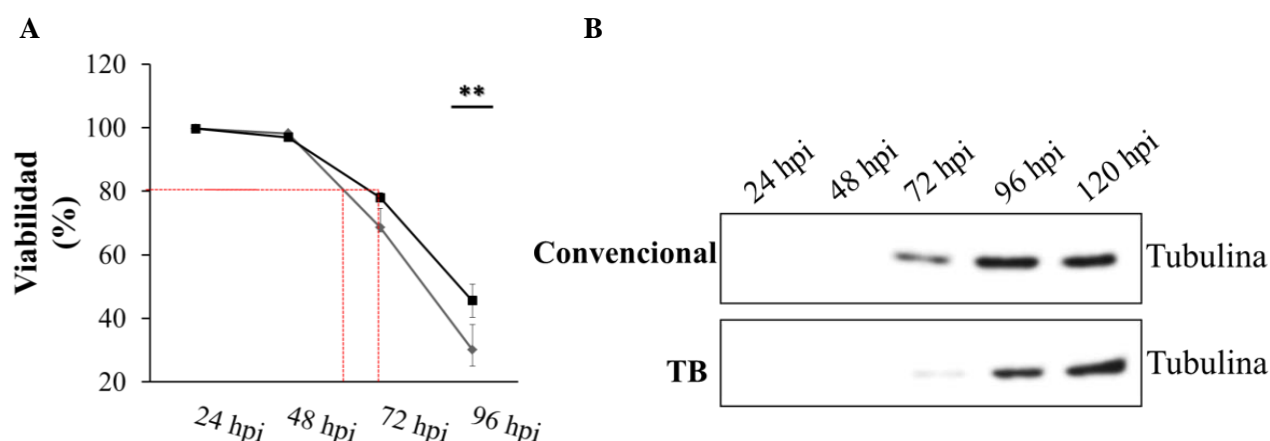


Figura 22: Determinación del tiempo óptimo de producción de la proteína HA18-529 en cultivos celulares a través de los parámetros de mantenimiento de la viabilidad e integridad del entorno intracelular. A) Monitorización de la caída del porcentaje de viabilidad por debajo del 80% (línea roja) en los cultivos infectados a baja MOI con los baculovirus recombinantes Conventional (◊) y TB (■), a través de la tinción excluyente con azul trypan (n=3). Los asteriscos representan las diferencias significativas (** p-valor < 0,01). B) Análisis indirecto del efecto de lisis celular en muestras de sobrenadantes (1,5 µl/carril) de cultivos infectados representativos del apartado A, a través de la inmunodetección de la tubulina citosólica en el medio extracelular.

Una vez determinados los tiempos óptimos de producción para los cultivos celulares infectados con cada vector, se procedió a la monitorización de la secreción de la proteína HA¹⁸⁻⁵²⁹ al medio extracelular. Para ello se procedió a la inmunodetección de la proteína HA¹⁸⁻⁵²⁹ en alícuotas de medio extracelular recogidas a diferentes tiempos post-infección (Figura 23). En el caso de los cultivos celulares infectados con el vector TB se observó una tendencia secretora más prolongada en el tiempo, llegando casi hasta las 96 hpi. Hasta ese momento, la presencia de la proteína de interés en el medio extracelular aparentemente sólo se podría deber a procesos de secreción y no de lisis celular, puesto que no se detectó tubulina intracelular en el medio. A partir de ese tiempo, la presencia de la proteína HA¹⁸⁻⁵²⁹ en el medio extracelular podría estar debida tanto a procesos de secreción como de lisis celular, debido a la detección de tubulina intracelular en el medio. Por otro lado, en los cultivos infectados con el vector Conventional, la secreción de la proteína HA¹⁸⁻⁵²⁹ se produjo sólo hasta las 48 hpi, puesto que a las 72 hpi también se liberó al medio proteína recombinante por lisis celular derivada de la infección, como se pudo constatar a través de la detección de tubulina intracelular en el medio (Figuras 23.A y S-12). Considerando este resultado, así como los tiempos óptimos de producción en cultivo celular mencionados anteriormente (Figura 23), se determinó la cantidad de proteína HA¹⁸⁻⁵²⁹ presente en el medio a través de una cuantificación, por medio de inmunodetección mediante WB, empleando una curva patrón como se describe en el Apartado 8.3.3. de Materiales y Métodos. De esta manera, se determinó que los cultivos infectados con el vector TB producían casi 2 veces más de proteína HA¹⁸⁻⁵²⁹ secretada a su tiempo óptimo de producción (72 hpi), respecto a la secretada al tiempo óptimo de producción de los cultivos infectados con el vector Conventional (48 hpi) (Figura 23.B).

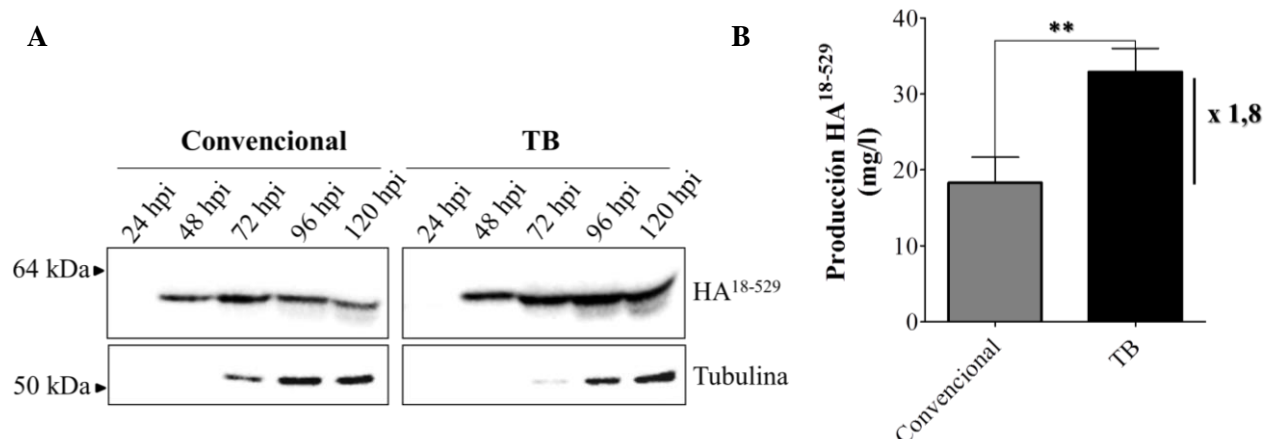


Figura 23: Estudio de la secreción de la proteína HA18-529 al medio extracelular. Cultivos de células Sf9 fueron infectados a baja MOI con el vector Convencional o TB y se procedió al análisis de A) la presencia de HA¹⁸⁻⁵²⁹ en el medio para cada infección a través de la inmunodetección de HA y tubulina (como control de lisis celular) mediante los anticuerpos específicos (5 y 1,5 µl/carril respectivamente) B) la cuantificación de HA¹⁸⁻⁵²⁹ secretada al medio en los tiempos óptimos para cada cultivo infectado (48 hpi Convencional, barra gris; 72 hpi, TB, barra negra), mediante WB junto con una curva patrón. Los asteriscos representan las diferencias significativas (** p-valor < 0,01, n=3).

Seguidamente, se realizó una caracterización más exhaustiva de la proteína HA¹⁸⁻⁵²⁹ secretada al medio, a los respectivos tiempos óptimos de producción para cada vector, a través del estudio de la presencia de modificaciones post-traduccionales tipo N-glicosilación (Figura 24). Tras el tratamiento con una enzima de-glicosilasa que reconoce y elimina uniones N-glicosídicas de estructuras de oligosacáridos complejos y/o residuos de manosa superiores, se pudo observar cómo la movilidad electroforética de la banda inmunoespecífica correspondiente a la proteína HA¹⁸⁻⁵²⁹ era menor para las muestras de ambos cultivos respecto a una muestra de los respectivos medios exentos de dicho tratamiento (Figura 24.A). Además, como control de este cambio de movilidad electroforético, se utilizó una reacción control con proteína HA¹⁸⁻⁵²⁹ purificada por medio de columna de afinidad y producida en larvas de *T.ni*. Seguidamente, se realizó una caracterización de la funcionalidad de la proteína secretada mediante ELISA, haciendo diluciones seriadas del sobrenadante de cada infección a los tiempos óptimos de producción determinados para cada caso (Figura 24.B). En este ensayo se confirmaba lo observado en la cuantificación por WB (Figura 24.B), ya que el título de proteína HA¹⁸⁻⁵²⁹ secretada al medio del cultivo, medida como la dilución máxima que daba valores por encima del punto de corte, era más de 2 veces mayor en el caso de los cultivos infectados con el vector TB que presentaron un título de 1/5120 respecto al de los infectados con el vector Convencional (título: 1/1280).

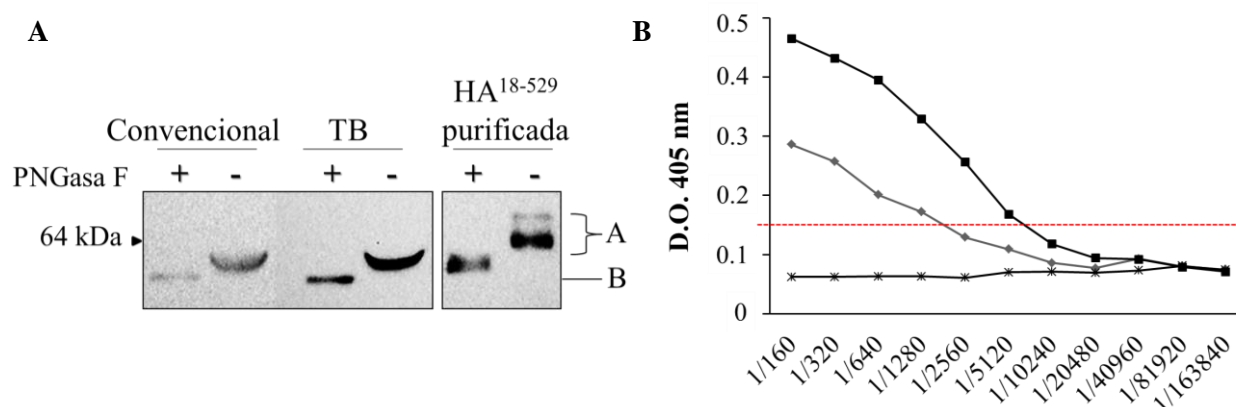


Figura 24: Caracterización funcional de la proteína HA18-529 secretada al medio extracelular. A) Tratamientos de de-glicosilación (+) de los sobrenadantes de cultivos de células Sf9 en suspensión infectados a baja MOI con el vector Convencional o TB, recogidos a sus tiempos óptimos de producción (48 y 72 hpi, respectivamente), donde se observa la proteína glicosilada (A) y la de-glicosilada (B). Como control se incluyó la proteína HA¹⁸⁻⁵²⁹ purificada de extractos de proteínas de *T.ni* tratada (+) y las respectivas muestras de sobrenadante sin tratar (-). B) Análisis de la proteína HA¹⁸⁻⁵²⁹ secretada al medio procedente de los sobrenadantes del Apartado A mediante un ELISA indirecto (Convencional (◆), TB (■), junto con el medio procedente de células Sf9 infectadas en suspensión en las mismas condiciones que en el Apartado A con un baculovirus control (*). El punto de corte se marca con una línea discontinua roja (D.O. 405 nm = 0,15).

Con objeto de conocer si la mayor secreción observada en la infección in vitro con el vector TB correlacionaba con una mayor expresión de la proteína HA¹⁸⁻⁵²⁹ sostenida a lo largo del transcurso de la infección, se estudió la cinética de su expresión a nivel intracelular (Figura S-13). A los respectivos tiempos óptimos de expresión (48-72 hpi), no se detectaron diferencias en cuanto al patrón de expresión de doble banda, que potencialmente representaba las formas glicosilada y no-glicosilada de HA¹⁸⁻⁵²⁹ a nivel intracelular (Figura S-13.A, HA¹⁸⁻⁵²⁹), ni en cuanto al rendimiento productivo (Figura S-13.B) entre los cultivos infectados respectivamente con el vector Convencional y TB. Sin embargo, a partir de tiempos muy tardíos se detectaron diferencias en el estado intracelular, representadas por una menor detección de la proteína tubulina en los extractos proteicos procedentes de la infección con el vector Convencional (Figura S-13.A, Convencional, Tubulina), que se vinculaba con una alteración del patrón electroforético de la proteína HA¹⁸⁻⁵²⁹. Concretamente, en el extracto proteico total soluble procedente de la infección con el vector Convencional apenas se detectó el doble bandeo a partir de las 96 hpi, siendo predominante la banda de menor peso molecular que correspondería posiblemente al polipéptido de HA¹⁸⁻⁵²⁹ carente de residuos N-glicanos unidos (Figura S-13.A, HA¹⁸⁻⁵²⁹). En contraposición, en el extracto del cultivo infectado con el vector TB, se mantuvo la detección del doble bandeo (por tanto, también la forma glicosilada) hasta 24 h más tarde, correlacionando un entorno intracelular menos proteolítico, coincidiendo con la mayor presencia de tubulina intracelular durante más tiempo (Figura S-13.A, TB, Tubulina).

5.1.2. Producción de la proteína HA¹⁸⁻⁵²⁹ en combinación con el tetrapéptido KDEL

De la misma manera que con el modelo anterior y con objeto de estudiar otro tipo de estrategias que mejoren la secreción, se procedió a determinar el tiempo óptimo de producción utilizando en este caso la señal de retención en ER KDEL (Figura S-11, C y D), basándonos nuevamente en los criterios de viabilidad y aparición de lisis celular utilizados para el modelo anterior (Figura 25). De nuevo, se determinó la viabilidad de células Sf9 en suspensión infectadas a una MOI de 0,1 pfu con los respectivos vectores a través de contejes de células viables con tinción excluyente de azul trypan durante el transcurso de la infección (Figura 25.A) y de manera similar, se observó cómo los cultivos infectados con el vector TB mantenían una viabilidad más sostenida respecto a los infectados con el vector Convencional durante el ensayo, encontrando diferencias significativas a tiempos de 96 hpi y correlacionando los valores más pequeños de porcentajes viabilidad en ambos cultivos con un creciente efecto de lisis celular, más acusado en el caso de la infección con el vector Convencional (Figura 25.B). Como resultado, la detección de tubulina intracelular en el medio de los cultivos infectados con el vector Convencional comenzó pasadas las 48 hpi y fue incrementándose hasta los tiempos finales de la infección, mientras que en los cultivos infectados con el vector TB se retrasó al menos 24 h. A raíz de estas observaciones, se determinaron las 48 hpi como tiempo óptimo de producción de la proteína HA¹⁸⁻⁵²⁹KDEL para los cultivos infectados con el vector Convencional y las 72 hpi, para los infectados con el

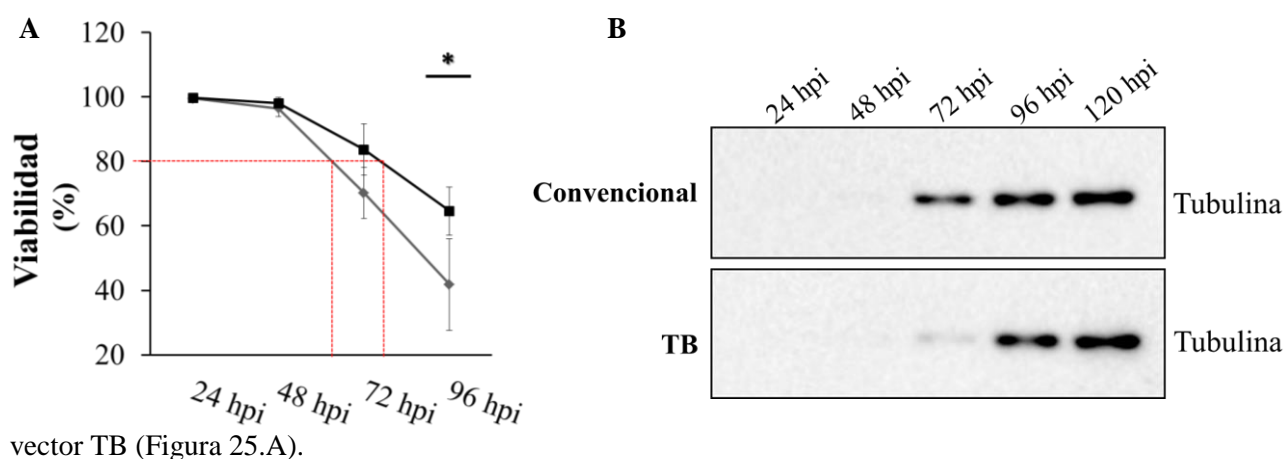


Figura 25: Determinación del tiempo óptimo de producción de la proteína HA18-529KDEL en cultivos celulares en suspensión. A) Análisis de la viabilidad de las células Sf9 infectadas a baja MOI con los vectores Convencional (◆) o TB (■), por debajo del 80% (línea roja) a través de la tinción excluyente con azul de trypan (n=3). El asterisco representa las diferencias significativas (* p-valor < 0,05). B) Detección de la aparición del CPE a través de la inmunodetección de la tubulina intracelular en el medio.

Seguidamente, se procedió al estudio comparativo de la producción de esta construcción en el extracto intracelular proteico total soluble de células infectadas a MOI de 0,1 pfu con los vectores Convencional y TB respectivamente. Para ello, se analizaron electroforéticamente, y se procedió a la

inmunodetección específica de la proteína HA¹⁸⁻⁵²⁹KDEL, las muestras proteicas obtenidas a lo largo del curso de la infección (24-120 hpi) (Figura S-14.A, HA¹⁸⁻⁵²⁹KDEL). Debido a la acción más temprana del promotor que controla la expresión de las proteínas heterólogas en el vector TB, la expresión de la proteína HA¹⁸⁻⁵²⁹KDEL se detectó desde las 24 hpi en estos cultivos infectados. Además, la expresión de la misma se mantuvo hasta tiempos más tardíos, como posible resultado de un CPE retardado característico de este vector. Prueba de ello fue el mantenimiento de la integridad intracelular, observado indirectamente a través de la detección de la proteína tubulina durante los tiempos muestreados (Figura S-14.A, Tubulina). Por el contrario, en muestras de cultivos infectados con el vector Convencional apenas se detectó tubulina a tiempos muy tardíos como resultado de la degradación de la misma, posiblemente como resultado de un mayor CPE. También, desde las 96 hpi, se detectó una banda inespecífica frente a la proteína HA¹⁸⁻⁵²⁹KDEL menos intensa en las muestras procedentes de la infección con el vector Convencional respecto a las del vector TB (Figura 14 A, HA¹⁸⁻⁵²⁹). Sin embargo, a los respectivos tiempos óptimos de producción, no se encontraron diferencias significativas en la producción de la proteína HA¹⁸⁻⁵²⁹KDEL en cultivos celulares infectados con los citados vectores (Figura 14.B).

Al no ser observadas diferencias significativas a nivel de producción intracelular de la proteína HA¹⁸⁻⁵²⁹KDEL, se procedió a analizar también el medio extracelular. Al igual que para el modelo anterior, se tomaron muestras de medio de cultivo de células Sf9 en suspensión e infectadas a una MOI de 0,1 pfu con los citados vectores (Figura 26). De esta manera, se pudo comprobar que, aunque a bajos niveles, en los cultivos infectados por el vector Convencional se secretaba la proteína HA¹⁸⁻⁵²⁹KDEL al medio. A partir de las 72 hpi, esta liberación de proteína HA¹⁸⁻⁵²⁹KDEL se acompañada de otras proteínas contenidas en el citosol, como la tubulina intracelular, debido a un efecto de liberación por lisis derivada del CPE (Figura 26.A). Sin embargo, en los cultivos infectados por el vector TB, desde tiempos de 48 hpi, se detectó una mayor presencia de la proteína HA¹⁸⁻⁵²⁹KDEL en el medio, manteniéndose incluso a tiempos post-infección en los que prácticamente no se estaban detectando proteínas intracelulares como la tubulina en el sobrenadante (72 hpi) (Figura 26.A).

Además, a los tiempos óptimos de producción para cada vector (48 y 72 hpi), se observó que la producción de HA¹⁸⁻⁵²⁹KDEL presente en el medio extracelular de los cultivos infectados con el vector TB era significativamente mayor (en torno a 3,5 veces más) que la registrada para el vector Convencional (Figura 26. B). Para confirmar este potencial tráfico a la superficie celular que posteriormente podría estar culminando en la secreción de HA¹⁸⁻⁵²⁹KDEL, se realizaron infecciones a alta MOI en células Sf21 en monocapa y se analizó la localización de la proteína HA¹⁸⁻⁵²⁹KDEL mediante inmunofluorescencia en células no permeabilizadas (Figura 26.C). A las 48 hpi, momento de la infección en el que ambos cultivos aún no presentaban un claro CPE, se detectó cómo la proteína HA¹⁸⁻⁵²⁹KDEL presentaba una localización en membrana plasmática para ambos cultivos, correlacionándose con una posible secreción de la proteína previamente observada en cultivos en suspensión (Figura 26.A). Pero, al

igual que se observó una mayor cantidad de proteína HA¹⁸⁻⁵²⁹KDEL en el medio extracelular de los cultivos infectados con el vector TB, también se constató una mayor intensidad de señal inmunofluorescente en el caso de las células infectadas con el vector TB, lo que sugirió una posible mayor acumulación de la proteína en la superficie celular de las mismas que potencialmente podría estar relacionada con esa mayor cantidad de proteína en el medio extracelular. Estos resultados fueron confirmados mediante un ELISA indirecto que permitió en la caracterización funcional de la proteína HA¹⁸⁻⁵²⁹KDEL en su conformación nativa presentes en sendos medios extracelulares (Figura 26.D), donde no se detectó señal positiva por encima del punto de corte establecido como muestra negativa para la muestra de la proteína HA¹⁸⁻⁵²⁹KDEL del medio extracelular procedente de la infección con el vector Convencional mientras que la muestra procedente de la infección con el vector TB mostró un título de 1/2560.

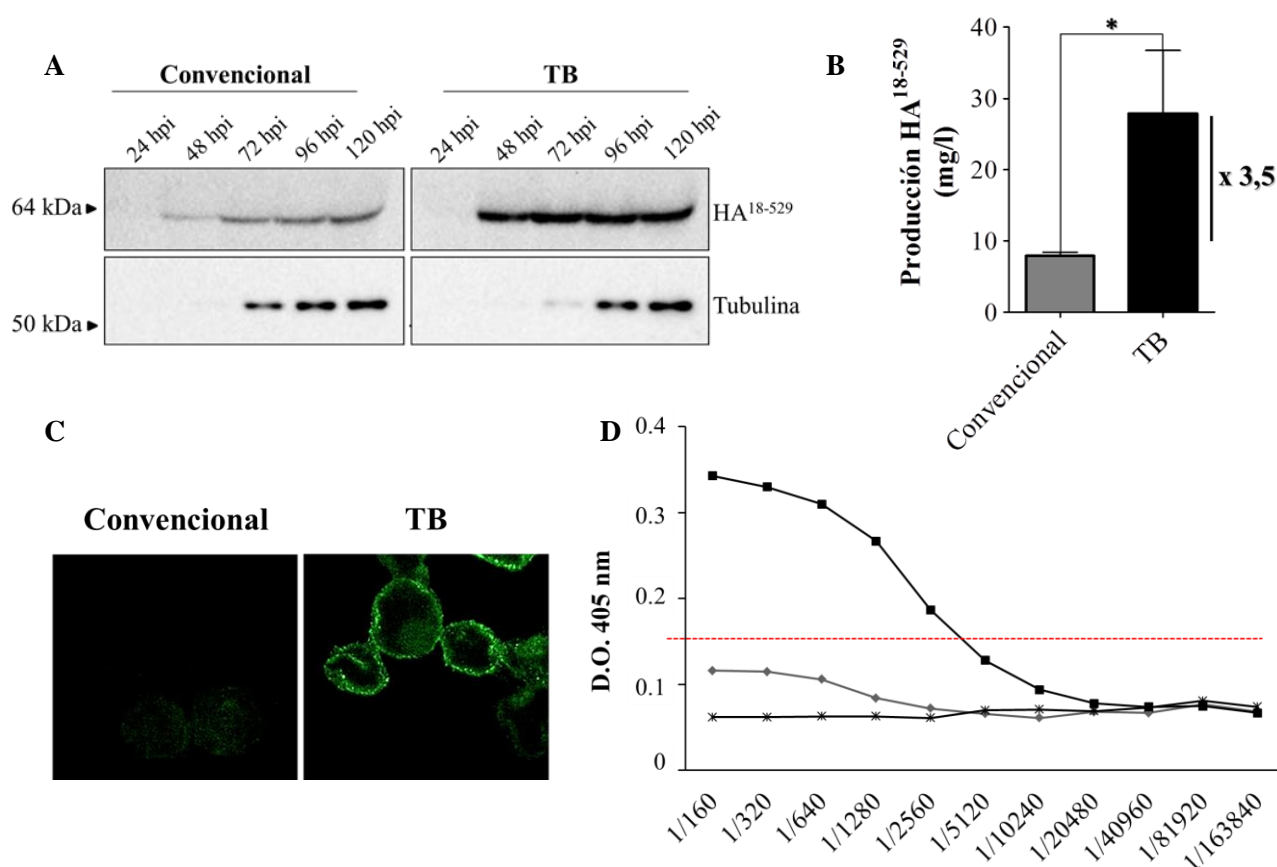


Figura 26: Estudio de la potencial secreción de la proteína HA18-529KDEL. A) Caracterización del medio extracelular (5 µl/carril) de células Sf9 en suspensión infectadas a baja MOI con los vectores Convencional o TB, a través la inmunodetección específica de las proteínas HA¹⁸⁻⁵²⁹KDEL y tubulina (1,5 µl/carril), ésta última como control del CPE. B) Cuantificación por WB y curva patrón de HA¹⁸⁻⁵²⁹ de la proteína HA¹⁸⁻⁵²⁹KDEL secretada al medio extracelular de los cultivos infectados del apartado A (Convencional: 48 hpi, barra gris; TB: barra negra, 72 hpi). El asterisco indica diferencias significativas (* p-valor < 0,05). C) Localización en membrana plasmática de la proteína HA¹⁸⁻⁵²⁹KDEL en células Sf21 infectadas a alta MOI con los vectores Convencional o TB (48 hpi), a través de inmunofluorescencia en células no permeabilizadas. D) Titulación de la proteína nativa presente en el medio extracelular de los cultivos del apartado A mediante ELISA indirecto (Convencional: \blacklozenge , TB: \blacksquare ; Sobrenadante procedente de la infección en las mismas condiciones con un baculovirus control: \blackstar). El punto de corte se marca con una línea discontinua roja (D.O. _{405 nm} = 0,15).

5.2. Estudio comparativo de la producción de VLPs de RHDV mediante la expresión de la proteína VP60 en infecciones de cultivos celulares de insecto con los vectores Convencional y TB

Como otra prueba de validación del vector TB como vector de expresión de proteínas complejas, seleccionamos la proteína estructural del virus de RHDV, no sólo por su capacidad de auto-ensamblarse y formar VLPs sino también por el interés de poder producir un antígeno vacunal eficaz y de acuerdo con los estándares éticos de calidad animal.

Con este fin, generamos los vectores baculovirus recombinantes Convencional y TB que expresaban la proteína VP60 del genotipo de RHDV 1 (AST89, Figura S-15). Seguidamente, se infectaron células Sf9 a baja MOI con los respectivos vectores y se procedió a la determinación del tiempo óptimo de producción de este modelo proteico. Al registrar los porcentajes de viabilidad de sendos cultivos infectados mediante su tinción con azul trypan, se observó que desde tiempos posteriores a las 48 hpi, las células infectadas con el vector TB mostraron un decrecimiento del porcentaje de viabilidad menos acusado que aquellas infectadas con el vector Convencional. Consecuentemente, tomando como referencia el momento de la infección en el que los cultivos mostraron porcentajes de viabilidad celular inferiores al 80%, se determinaron como tiempos óptimos de expresión de la proteína VP60, 72 hpi para las células infectadas con el vector Convencional y 96 hpi para las infectadas con el vector TB (Figura 27.A).

Tras la determinación de los tiempos óptimos de expresión, se analizó la expresión de la proteína VP60 en los extractos procedentes de las células infectadas a baja MOI con el vector Convencional o el vector TB (Figura 27.B). Se procedió a resolver electroforéticamente y marcar específicamente con un suero frente a VP60 los extractos totales solubles procedentes de sendas infecciones extraídos como se detalla en el Apartado 8.1.1. de Materiales y Métodos. En la muestra procedente de la infección con el vector Convencional, la proteína VP60 fue inmunodetectada como una banda de mayor intensidad de un peso molecular aproximado de 60 kDa y desde las 48 hpi hasta el final del ensayo se acompañó de bandas con movibilidades electroforéticas superiores también reactivas al suero empleado, las cuales podrían representar formas de plegamiento aberrante (Figura 27.B, Convencional, VP60). En las muestras procedentes de la infección con el vector TB no sólo se detectaron mayores cantidades de la proteína VP60, representado por una mayor intensidad de la banda proteica reactiva al suero, sino que su expresión se caracterizó por la completa ausencia de formas de plegamiento anómalo (Figura 27.B, TB, VP60). Además, al analizar el estado del entorno intracelular se observó cómo los extractos procedentes de la infección con el vector TB mantenían la integridad de elementos intracelulares, como la tubulina (Figura 27.B, TB, Tubulina), más estables a los tiempos tardíos de la infección, correlacionando con el mantenimiento de la viabilidad del cultivo infectado observada (Figura 27.A). En contraposición, los extractos infectados con el vector Convencional mostraron una degradación de elementos intracelulares detectable al menos 24 h antes (Figura 27.B, Convencional, Tubulina). Como se observó una mayor expresión de la proteína VP60 en los cultivos infectados por el vector TB durante todo el ensayo, se

comprobó si este aumento de expresión de la proteína VP60 correlacionaba con un aumento en la producción de VLPs (Figura 27.C). Para ello, se purificaron las VLPs procedentes de los extractos intracelulares pertenecientes a los cultivos infectados con el vector Convencional o el vector TB (72 hpi) y se analizaron mediante microscopía electrónica (Apartados 8.3.7. y 9.2, sección Materiales y Métodos). En la muestra procedente de las células infectadas con el vector TB se observó que no sólo la proteína VP60 se expresaba adecuadamente y en mayor cantidad sino también que se vinculaba con un mayor nº de VLPs producidas al tiempo óptimo de producción de las células infectadas con el vector Convencional. Además, al estudiar en detalle el tamaño de las VLPs procedentes de las respectivas muestras, se observó que el aumento de producción de la proteína VP60 en las células infectadas con el vector TB no parecía afectar a la correcta conformación y tamaño de las VLPs, ya que mostraron el mismo tamaño esperado (aproximadamente 40 nm) que el observado en las VLPs de la muestra procedente de la infección con el vector Convencional. Finalmente, se procedió a la cuantificación de la proteína VP60 expresada en las células Sf9 infectadas con el vector Convencional y TB a los respectivos tiempos óptimos de producción de este modelo, mediante una curva patrón con BSA (Figura 27.D). De tal manera que se observó que la proteína VP60 se expresó en las células infectadas con el vector TB en cantidades hasta casi 4 veces superiores a las obtenidas cuando empleaba el vector Convencional para la infección, correlacionando con otros datos previamente recogidos tanto en esta Tesis como en otros trabajos del laboratorio.

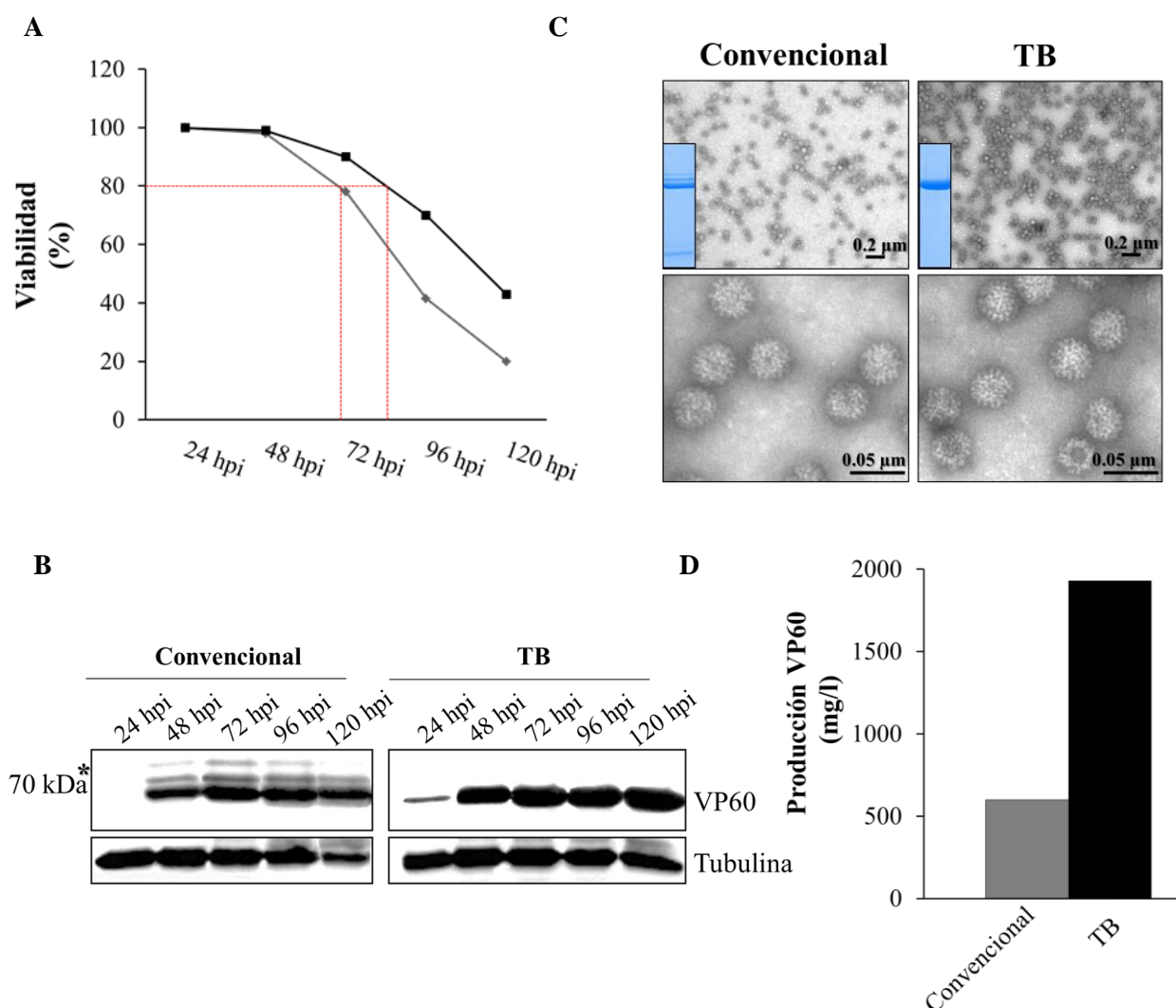


Figura 27: Determinación del tiempo óptimo de producción y estudio de la cinética de expresión de la proteína de VP60 en cultivos celulares. A) Seguimiento de la viabilidad de los cultivos infectados a baja MOI con los vectores recombinantes Convencional (◆) y TB (■), donde se marca la caída del porcentaje de viabilidad por debajo del 80% (línea roja) determinada a través de la tinción excluyente con azul trypan. B) Cinética de expresión intracelular de la proteína VP60 en los cultivos citados en el apartado A al detectar por medio de inmunodetección específica de la proteína VP60 en el extracto proteico total soluble (30 μg/carril). Además, se utilizó la inmunodetección de la tubulina citosólica como marcador de la lisis intracelular. C) Cuantificación de la proteína VP60 expresada en los cultivos infectados a baja MOI con los vectores Convencional y TB recombinantes al tiempo óptimo de producción (72 hpi) mediante una curva patrón. D) Análisis de la conformación tridimensional y de la cantidad de VLPs correctamente ensambladas mediante técnicas de ME.

Discusión

1. Caracterización de la sobre-expresión de Ac-IE01 en cultivos infectados con el vector TB

Trabajos previos del laboratorio concluyeron con el diseño del vector TB, cuyo uso en infecciones de células de insecto no sólo permite un incremento de la expresión de la proteína recombinante de interés, sino que también prolonga la viabilidad del cultivo durante la infección y conserva un entorno intracelular menos lítico y hostil para su producción (Gómez-Sebastián, López-Vidal et al. 2014, Lopez-Vidal 2014). Con el objeto de caracterizar la sobre-expresión de los factores codificados por la secuencia *Ac-ie-01* en el vector TB (Figura S-7), se procedió a la inmunodetección de las proteínas Ac-IE y Ac-IE en extractos proteicos de células Sf21 infectadas con los vectores Convencional y TB respectivamente, donde no se detectaron diferencias de expresión de los transactivadores en los primeros estadios de la infección (6-24 hpi, Figura 5.A), ya que la expresión de los transactivadores a esos tiempos y en ambos vectores, estaba controlada por sus propios promotores *ie0* e *ie1* (Chisholm and Henner 1988, Kovacs, Guarino et al. 1991, Theilmann and Stewart 1993, Choi and Guarino 1995, Pullen and Friesen 1995, Friesen 1997, Lu, Du et al. 2003). A partir de tiempos tardíos (48-72 hpi, Figura 5.B), en los que sólo el promotor *ie1* posee actividad (Pullen and Friesen 1995), en la muestra infectada con el vector Convencional sólo se detectó la expresión de la proteína Ac-IE1 mientras que en la infectada con el vector TB el promotor *polh* permitió la expresión de las proteínas Ac-IE0 y Ac-IE1 por el mismo cADN extra (Figura S-2) (Huijskens, Li et al. 2004, Stewart, Huijskens et al. 2005, Sokal, Nie et al. 2014) y en mayor cantidad coincidiendo con su tiempo óptimo de actividad (Blissard 1996, Kelly, King et al. 2007, Theilmann and Blissard 2008, Rohrmann 2013). Considerando la dependencia de la función transactivadora de la proteína IE1 en sus niveles de expresión y oligomerización (Landais, Vincent et al. 2006), y la relación existente entre la cantidad de las proteínas IE0 e IE1, el predominio de las formas homo/heterodiméricas de los transactivadores y su funcionalidad (Ohresser, Morin et al. 1994, Ribeiro, Hutchinson et al. 1994, Choi and Guarino 1995, Rodems and Friesen 1995, Kremer and Knebel-Mörsdorf 1998, Lu, Du et al. 2003, Huijskens, Li et al. 2004, Lu, Rivkin et al. 2005, Stewart, Huijskens et al. 2005, Sokal, Nie et al. 2014), se puede vincular la alteración del patrón temporal de expresión de los factores transactivadores Ac-IE0 e IE1, observada en infecciones con vectores TB, con los efectos posteriormente descritos en este trabajo de Tesis.

Seguidamente, se estudió si esta sobre-expresión podría repercutir en la incorporación aleatoria de estas proteínas en las partículas víricas durante su empaquetamiento (Figura 5.C), ya que se han localizado en partícula BV algunas proteínas heterólogas con altos niveles de expresión (Carbonell and Miller 1987), proteínas celulares presentes en el citoplasma (Wang, Deng et al. 2010), e incluso, en partícula ODV, ciertas proteínas víricas implicadas en la replicación del vADN (Braunagel, Russell et al. 2003). La presencia de factores transactivadores en partícula vírica se ha descrito en otros modelos víricos, como en el virus HSV-1 donde el transactivador VP16 forma parte de la partícula vírica (Heine, Honess et al. 1974, Dalrymple, McGeoch et al. 1985). Además, se ha descrito que el transactivador IE1 acompaña al BV en algunos baculovirus (Theilmann and Stewart 1993), y que las proteínas Ac-IE0 y Ac-IE-1 oligomerizan en

el citoplasma antes de ser transportados al núcleo celular (Olson, Wetter et al. 2002, Luria, Lu et al. 2012), por lo que era plausible que en sobre-expresión algunos factores pudieran ser incorporados en el virion BV durante su morfogénesis. Sin embargo, las proteínas *Ac-IE0* y *Ac-IE1* no fueron detectadas ni en partículas víricas purificadas del vector TB ni del vector Convencional (Figura 5.C), mostrando que su sobre-expresión no parecía afectar su correcta translocación nuclear descrita en el virus parental (Okano, Mikhailov et al. 1999, Olson, Wetter et al. 2002, Luria, Lu et al. 2012, Nagamine, Saito et al. 2015), ratificando que la proteína *Ac-IE1* no forma parte del BV de *AcMNPV* como ya se había descrito (Choi and Guarino 1995, Braunagel, Russell et al. 2003, Wang, Deng et al. 2010) y descartando que los posteriores efectos observados en células infectadas tempranamente con el vector TB estuvieran relacionados con la presencia directa de las proteínas *Ac-IE0* y *Ac-IE-1* en la partícula vírica.

Para finalizar la caracterización de la infección con el vector TB sobre células de insecto, se analizó si la incorporación de una copia adicional de la secuencia *Ac-ie-01* influía en la producción de progenie vírica, para lo que se comprobó la expresión de la principal glicoproteína de envoltura del BV (*Ac-GP64*, (Blissard and Wenz 1992), Figura 6.A) y la producción de partículas infectivas a tiempos de recogida del inóculo vírico (72 hpi, Figura 6.B). No obstante, al no detectarse diferencias entre el vector Convencional y el vector TB en ninguna de las dos aproximaciones citadas, descartamos que los efectos asociados a la infección con el vector TB estuvieran relacionados con un aumento de la producción vírica.

2. Caracterización del *efecto protector* celular de la infección con el vector TB

En este trabajo de Tesis, se acuñó el término *efecto protector* para definir al retardo en la aparición de los signos del CPE mostrado por cultivos infectados con el vector TB respecto a los infectados con el vector Convencional. En inicio, este efecto protector fue detectado en células Sf9 en suspensión infectadas a baja MOI, en los que se contabilizaron porcentajes de viabilidad significativamente mayores en infecciones con el vector TB respecto a las infectadas con el vector Convencional a tiempos tardíos de la infección (Figura 7.A). Este retraso en la caída de la viabilidad de los cultivos de al menos 24 h en los cultivos infectados con el vector TB se asemejaba al descrito en otros trabajos en los que se emplea la suplementación de los medios de cultivo con componentes de la hemolinfa para retrasar el efecto lítico de la infección con baculovirus (Rhee, Kim et al. 1999, Rhee and Park 2000). Este dato junto con datos previos del laboratorio en los que se había observado una mejor conservación de elementos intracelulares en cultivos infectados con el vector TB (Gómez-Sebastián, López-Vidal et al. 2014, Lopez-Vidal 2014), nos condujeron al estudio detallado del entorno intracelular de estos cultivos por ME (Figura 7.B). Mediante el recuento del n° de células íntegras presente en las respectivas muestras de los cultivos celulares infectados, se observó una correlación entre un mayor porcentaje de células íntegras y de viabilidad en el cultivo infectado con el vector TB a las 96 hpi (96 hpi, p-valor < 0.01, Figura 7.A). Además, este resultado se vinculaba con la diferencia de cantidad en la tubulina intracelular, detectada inmuno-específicamente de modo más estable a lo largo de la infección en los extractos proteicos procedentes de la infección con el vector TB en comparación con la detectada en la infección con el vector

Convencional (Figura 7.B, Tubulina). Finalmente, se realizó una prueba de actividad reductora mitocondrial que independientemente validase la integridad intracelular y el retardo en el CPE observado previamente (Figura 7.C). Desde las 72 hpi, la actividad mitocondrial fue mayor y estadísticamente significativa en los cultivos infectados con el vector TB respecto a la infección con el vector Convencional (Figura 7.C). Este dato completó los mostrados anteriormente y correlacionaba con los resultados publicados respecto a la conexión entre el retraso de la caída de la viabilidad del cultivo infectado y el mantenimiento de la actividad mitocondrial (Rhee, Kim et al. 1999, Rhee and Park 2000, Vieira, Pereira et al. 2006, Vieira, Pereira et al. 2010), en los que además se relacionaba el citado mantenimiento con un retraso en la aparición de la apoptosis en los cultivos infectados.

2.1. Efecto protector sobre las mitocondrias de las células de insecto infectadas con el vector TB

Tras el resultado anterior, nos planteamos comprobar el estado estructural de las mitocondrias para lo que se analizaron imágenes de ME procedentes de cultivos de células Sf9 infectados a baja MOI con los vectores Convencional y TB (Figura 8). Al tiempo seleccionado (48 hpi) no se habían encontrado diferencias estadísticamente significativas ni en porcentajes de viabilidad ni en actividad mitocondrial (Figura 7.A y C), aunque sí se observaron diferencias a nivel de la morfología mitocondrial. En concreto, las mitocondrias procedentes de muestras infectadas con el vector TB presentaban una morfología algo menos afectada y con crestas mitocondriales más definidas que las de la muestra infectada con el vector Convencional, lo que correlacionaría con un retraso en la aparición de la apoptosis y en el entorno intracelular lítico que mantuviese estable durante al menos 24 h más la estructura y funcionalidad mitocondrial en los cultivos infectados con el vector TB. Existen algunos trabajos que cuestionan la afectación de la función mitocondrial durante la infección por baculovirus y que describen su mantenimiento en cuerpos apoptóticos celulares derivados de la infección (Clem, Fechheimer et al. 1991). Por el contrario, hay otros trabajos en los que se han descrito alteraciones de la estructura mitocondrial y del potencial de su membrana en cultivos infectados con baculovirus (Vieira, Pereira et al. 2006, Liu, Shu et al. 2012), siendo la primera un signo de alteración funcional y apoptosis en estadios tardíos conservado entre algunos organismos (Hacker 2000, Abdelwahid, Rolland et al. 2011). Pese a esta controversia y dado que habíamos detectado diferencias al comparar las mitocondrias de los dos cultivos infectados a nivel de cambios estructurales a tiempos tardíos (48 hpi) y funcionales a tiempos muy tardíos (72-96 hpi), nos planteamos comprobar el estado mitocondrial a tiempos tempranos de la infección mediante el estudio de la salida del citocromo C desde el espacio inter-membranoso mitocondrial al citosol (Figura 9), evento considerado como temprano de la activación de apoptosis en algunos tipos celulares (Hacker 2000). Al analizar la salida de citocromo C mediante técnicas de inmunofluorescencia, se pudo observar un alto grado de co-localización de las señales de mitocondria y citocromo C en las células infectadas con el vector TB a las 12 hpi, mientras que dicha co-localización se perdió en las infectadas con el vector Convencional (Figura 9.A). Además, se analizó el citocromo C presente en las fracciones proteicas que contenían las proteínas del citosol (Fracción ligera) y de las mitocondrias (Fracción pesada) de cultivos de

células Sf9 infectados a baja MOI con los vectores Convencional y TB a las 12 hpi (Figura 9.B), donde se observó una menor presencia de citocromo C liberado al citosol (Fracción ligera) y, consecuentemente, más cantidad del mismo retenido en mitocondria (Fracción pesada) en la muestra infectada con el vector TB respecto a la muestra infectada con el vector Convencional. Ambos abordajes sugerían una mayor retención del citocromo C en los cultivos infectados con el vector TB a tiempos tempranos de la infección con respecto a la liberación producida bajo la infección con el vector Convencional (Liu, Peng et al. 2007). En células de mamífero, los cambios estructurales de las mitocondrias y la consecuente liberación de citocromo C son las principales señales de activación de la vía intrínseca de la apoptosis (Liu, Kim et al. 1996, Bossy-Wetzel, Newmeyer et al. 1998, Desagher and Martinou 2000, Abdelwahid, Rolland et al. 2011), mientras que en insectos existe controversia en cuanto a la participación de la liberación del citocromo C en la activación de la cascada apoptótica. Hay varios trabajos que directamente sostienen la implicación de la salida del citocromo C en la activación de la apoptosis en células de insecto (Mohan, Taneja et al. 2003, Sahdev, Taneja et al. 2003, Liu, Peng et al. 2007 , Kumarswamy, Seth et al. 2009, Shan, Liu et al. 2009, Liu, Yang et al. 2012, Liu, Shu et al. 2012, Chandna, Suman et al. 2013, Chen, Hu et al. 2015), apoyados con la observación de alteraciones en la estructura mitocondrial a consecuencia de la infección baculovirus en estas células (Liu, Shu et al. 2012). Sin embargo, hay otros trabajos que cuestionan su participación en el disparo de la señal apoptótica en insectos (Miller, Luque et al. 2002, Wang and Clem 2011). No obstante, en función de los resultados observados en este trabajo de Tesis, el *efecto protector* en la infección de células de insecto con vector TB estaría asociado a una menor liberación del citocromo C, relacionado con una mayor integridad mitocondrial, que retrasaría el disparo de la apoptosis, representado por una menor actividad caspasa, y un retraso en el desarrollo del CPE característico de la infección por baculovirus.

2.2. Efecto protector celular del vector TB sobre la activación de la ruta apoptótica

Existen trabajos que sustentan la activación de las caspasas efectoras en la presencia del citocromo C en lepidópteros (Huang, Deveraux et al. 2000, Mohan, Taneja et al. 2003, Sahdev, Taneja et al. 2003, Liu, Peng et al. 2007 , Kumarswamy, Seth et al. 2009, Shan, Liu et al. 2009, Liu, Shu et al. 2012, Chen, Hu et al. 2015), y dado que habíamos observado una menor liberación de citocromo C en cultivos infectados con el vector TB (Figura 9), consideramos si el *efecto protector* asociado a la infección con el vector TB en células de insecto podría estar también relacionado con una menor activación de la vía ejecutora de la apoptosis. Tras comprobar que el sustrato elegido para la detección de actividad de caspasa efectora sólo era procesado catalíticamente en células tratadas con la droga pro-apoptótica actinomicina D (Figura S-8.A), se realizó una cinética de dicha actividad en cultivos infectados con el vector Convencional (Figuras S-8.B), en la que se observó un bloqueo de la actividad de efectora hasta el punto de presentar menor o la misma actividad que las células control no infectadas, al igual que otros grupos describen como consecuencia de la expresión de la proteína P35 en células Sf21 infectadas con AcMNPV (Kelly, King et al. 2006, Ikeda, Yamada et al. 2011, Saganuma, Ushiyama et al. 2011). Esta proteína

bloquea covalentemente a las caspasas efectoras activadas (Alnemri, Robertson et al. 1992, Bertin, Mendrysa et al. 1996, Ahmad, Srinivasula et al. 1997, Zhou, Krebs et al. 1998, Kelly, King et al. 2006, Ikeda, Yamada et al. 2011) y su presencia en los vectores derivados de AcMNPV, como los utilizados en esta Tesis, explicaría los resultados obtenidos en la cinética comparativa de actividad caspasa efectora entre cultivos infectados con el vector Convencional o el vector TB, donde apenas se detectaron diferencias a excepción del tiempo 12 hpi (Figura 10.A), en el que se detectó una recurrente tendencia hacia una menor actividad de caspasa efectora en los infectados con el vector TB. Para poder magnificarla y verificar que en las infecciones con el vector TB podía existir un elemento adicional a la proteína P35 que retrasase la activación de la ruta apoptótica, se optó por estresar a los cultivos infectados con la droga pro-apoptótica actinomicina D, cuya inducción de apoptosis era frenada en cultivos celulares infectados con el virus salvaje AcMNPV gracias a la acción de la proteína Ac-P35 (Crook, Clem et al. 1993, Cartier, Hershberger et al. 1994, Clem and Miller 1994). Con este ensayo se observó que sendos cultivos infectados mostraban valores menores de actividad caspasa efectora respecto a los cultivos control simplemente tratados con la droga, correlacionando así con el bloqueo previamente descrito, aunque fueron los cultivos infectados con el vector TB los que mostraron valores de actividad caspasa efectora destacablemente más bajos que los mostrados por los infectados con el vector Convencional (Figura 10.B). Como este resultado sugería la posible actuación adicional sobre la ruta apoptótica, decidimos comprobar si el elemento diferencial presente en las infecciones con el vector TB actuaba en estadios anteriores a la activación de caspasas efectoras. Al igual que en otros organismos, las células de lepidópteros presentan una estructura jerarquizada en la activación de caspasas, donde las efectoras son catalíticamente activadas por las caspasas iniciadoras activadas (Cooper, Granville et al. 2009, Courtiade, Pauchet et al. 2011) y en *S. frugiperda*, se ha identificado a *Sf-Dronc* como la caspasa iniciadora responsable de activar catalíticamente a la principal caspasa efectora *Sf-caspasa-1* (Huang, Covicristov et al. 2013). Tras comprobar su correcta detección mediante una cinética de activación en células Sf21 apoptóticas incubadas en presencia de actinomicina D (Figura 11.A), realizamos otra cinética en cultivos infectados a alta MOI con los vectores Convencional o TB (datos no mostrados). De manera similar a lo descrito por otros autores (Liu, Shu et al. 2012), se observó actividad coincidente de caspasas efectoras e iniciadoras a las 12 hpi (Figuras 10.B, 11.B y datos no mostrados), momento en el que la muestra infectada con el vector Convencional mostró valores de actividad de caspasa iniciadora significativamente superiores a los valores de las muestras control no infectada y a la infectada con el vector TB, que mostraron prácticamente la misma actividad (Figura 11.B). Estos resultados junto con los anteriormente descritos en esta Tesis, sugerían que la infección con el vector TB podría ejercer su *efecto protector* mediante un retardo de la alteración de la estructura mitocondrial que permitía una menor liberación del citocromo C al citosol y consecuentemente, un retraso en la activación de la ruta apoptótica mediante un retardo en la actividad caspasa.

2.3. Estudio de los agentes responsables del *efecto protector* en células infectadas con el vector TB

Ya hemos citado el papel anti-apoptótico de la proteína Ac-P35 (Alnemri, Robertson et al. 1992, Bertin, Mendrysa et al. 1996, Ahmad, Srinivasula et al. 1997, Zhou, Krebs et al. 1998, Kelly, King et al. 2006, Ikeda, Yamada et al. 2011), cuyo promotor puede ser activado en *trans* por la proteína IE1 como se ha descrito en ensayos de expresión transitoria (Nissen and Friesen 1989, Friesen 1997). Considerando, la alteración del patrón temporal de expresión para los transactivadores Ac-IE0 e IE1 en el vector TB y los datos referentes a la actividad de caspasas efectoras, decidimos comparar el patrón de expresión de la proteína Ac-P35 en extractos proteicos procedentes de infecciones con los vectores Convencional o TB (Figura 12). En ellos no se detectaron diferencias significativas a nivel de expresión de Ac-P35, explicando la ausencia de diferencias estadísticamente significativas en el ensayo de actividad de caspasa efectora sin inducción de estrés pro-apoptótico con actinomicina D (Figura 10.B).

Por otro lado, dado que otros autores han descrito la regulación de la cascada apoptótica mediante la implicación de los IAP debido al bloqueo de la activación de las caspasas iniciadoras (Huang, Deveraux et al. 2000, Liao, Yang et al. 2002, Cerio, Vandergaast et al. 2010, Berthelet and Dubrez 2013) y nuestras observaciones en relación a la integridad mitocondrial y liberación de citocromo C (Figuras 8 y 9), nos planteamos si el vector TB podría estar ejerciendo su *efecto protector* mediante la alteración de la expresión de estas proteínas. Inicialmente, se comprobó la expresión transcripcional de los IAP víricos, con función anti-apoptótica descrita por su bloqueo de la activación catalítica de las caspasas (Crook, Clem et al. 1993, Birnbaum, Clem et al. 1994, Manji, Hozak et al. 1997, Maguire, Harrison et al. 2000, Miller, Luque et al. 2002, Ikeda, Yanagimoto et al. 2004, Carpes, de Castro et al. 2005, Kim, Xiao et al. 2007) y que han sido identificados en la partícula vírica extracelular (Wang, Deng et al. 2010). Como se observa en la Figura 13, no se detectaron diferencias a nivel transcripcional para el gen *Ac-iap* por lo que, apoyados en los trabajos que sugieren que en AcMNPV estos genes no presentan actividad anti-apoptótica en cultivo celular (Clem and Miller 1994, Griffiths, Barnett et al. 1999), descartamos que el *efecto protector* sobre células de insecto infectadas con el vector TB pudiese estar relacionado con ellos. También se comprobó la expresión transcripcional de los IAP celulares, donde resaltó la diferencia transcripcional entre las muestras procedentes de los respectivos cultivos infectados (*Sf-iap*, Figura 13), de manera que se estudió en detalle su patrón transcripcional (Figura 14). Anteriormente se ha descrito que los baculovirus inducen un efecto de arresto traduccional en la célula infectada, que se inicia con el cese de la actividad transcripcional de los genes del hospedador a las 18 hpi (Vlak, Smith et al. 1981, Ooi and Miller 1988, van Oers, van der Veken et al. 2001, Salem, Zhang et al. 2011, Chen, Zhong et al. 2014); en nuestro ensayo se observó dicho cese en el nivel transcripcional de *Sf-iap* en ambas muestras infectadas, remarcándose a las 18 hpi. No obstante, desde las 6 hpi se observó una mayor acumulación del transcrito de *Sf-iap* en la muestra infectada con el vector TB respecto a la infectada con el vector Convencional, manteniéndose a niveles de expresión transcripcional prácticamente similares a los observados en las células control no infectadas, encontrándose diferencias estadísticamente significativas (Figura 14.B)

Estos datos parecerían relacionar el *efecto protector* de la infección con el vector TB con un posible retardo en el cese transcripcional que precede al arresto traduccional de proteínas del hospedador como los IAP celulares. Para estudiar si el efecto era concreto de estas proteínas o general, se seleccionó un gen celular sensible al apagado génico por infección con baculovirus, como aquellos implicados en el tráfico proteico (*receptor de KDEL tipo 2A* (Salem, Zhang et al. 2011)) y se comprobó su nivel transcripcional (Figura 15), volviéndose a observar que la infección con el vector TB estaría retardando el cese transcripcional de los genes de la célula huésped. Curiosamente, aunque ambas muestras mostraron el patrón de regulación transcripcional previamente descrito para este gen (Salem, Zhang et al. 2011), se observó ese mismo patrón pero más acusado en cuanto a regulación positiva y un menor arresto consecutivo en la muestra procedente de la infección con el vector TB respecto a la del vector Convencional. Por lo tanto, era plausible pensar que la infección con el vector TB retarda el cese transcripcional de genes del hospedador. En el caso concreto de la proteína *Sf-IAP* la infección con el vector TB permitiría la expresión de este regulador clave de la homeostasis celular de manera más sostenida en el tiempo, retrasando el disparo y la amplificación de señales de muerte celular independientemente del efecto de *Ac-P35*, explicando así el *efecto protector* sobre los cultivos infectados con el vector TB (Figura 28). En correlación con estos datos, hay trabajos que han sugerido que la apoptosis derivada de la infección por baculovirus en células de insecto podría estar disparada por la degradación y no reposición, por efecto del arresto traduccional de la infección, de proteínas de vida media corta como los IAP celulares (Schultz and Friesen 2009, Cerio, Vandergaast et al. 2010, Vandergaast, Schultz et al. 2011, Vandergaast, Mitchell et al. 2015), para los que se ha descrito una acción anti-apoptótica limitada y reversible (Manji and Friesen 2001, Ishikawa, Ikeda et al. 2003, Ikeda, Yamada et al. 2011). Es posible que las proteínas *Sf-IAP* y *Sf-Dronc* interaccionen de igual manera a como lo hacen sus homólogos de *Drosophila* (Muro, Hay et al. 2002, Courtiade, Pauchet et al. 2011), de tal manera que las células de *S. frugiperda* estarían constantemente expresando *Sf-Dronc* que a su vez estaría continuamente anulado por su interacción con *Sf-IAP*, que induce su degradación, y cualquier alteración de este equilibrio, por ejemplo por cese de la expresión o rápida degradación de *Sf-IAP*, activaría a *Sf-Dronc* y la cascada apoptótica. Si la infección con el vector TB permite retrasar la disminución del *Sf-IAP* a nivel transcripcional (Figuras 10 y 11), se explicarían una menor actividad caspasa iniciadora (Figura 8.B) y el retraso en la activación de la cascada apoptótica (Figura 7.B). Aunque no ha sido contemplado en este trabajo de Tesis, no descartamos que *efecto protector* en las infecciones con el vector TB pueda también estar asociado con un aumento de la estabilidad de la proteína *Sf-IAP* mediante la represión de proteínas antagonistas relacionadas con su rápida degradación (Holley, Olson et al. 2002, Settles and Friesen 2008, Bryant, Zhang et al. 2009, Vandergaast, Schultz et al. 2011, Wang and Clem 2011, Berthelet and Dubrez 2013, Wu, Wu et al. 2013, Vandergaast, Mitchell et al. 2015). Adicionalmente, otros trabajos muestran que la pérdida de los IAP celulares sucede como una respuesta celular tras la replicación del vADN en infecciones de células de insecto con baculovirus (Vandergaast, Schultz et al. 2011).

Considerando que para la replicación del vADN se requiere el mantenimiento del patrón de expresión preciso de homo/heterodímeros de *Ac-IE0/IE1* (Huijskens, Li et al. 2004, Lu, Rivkin et al. 2005, Stewart, Huijskens et al. 2005, Luria, Lu et al. 2012, Sokal, Nie et al. 2014), y aunque no ha sido contemplado en este trabajo, también sería plausible que la alteración del patrón temporal de expresión de los factores transactivadores descrito para el vector TB pudiese alterar de alguna manera la replicación del vADN vírico y retrasar las respuestas celulares de disparo de la DDR, apagado génico y muerte celular típicas de baculovirus, representado en forma de *efecto protector*. Esta hipótesis estaría apoyada por trabajos en los que se sugiere que factores de expresión temprana estarían relacionados con la alteración de la DDR por parte del baculovirus en beneficio de su propia replicación (Mitchell and Friesen 2012, Mitchell, Byers et al. 2013). También, este patrón de sobre-expresión de las proteínas inmediatamente tempranas *Ac-IE0* y *Ac-IE-1* en los cultivos infectados con el vector TB a tiempos tardíos hace pensar que los resultados aquí descritos a tiempos tempranos (Figuras 9, 10.B, 11.B, 14) se puedan deber a la presencia de algún factor, celular o vírico, asociado al inóculo. Se ha sugerido que las proteínas *Ac-IE0* y *Ac-IE1* podrían interactuar con elementos celulares (Kremer and Knebel-Mörsdorf 1998, Lu, Rivkin et al. 2005) e incluso activar la expresión de determinados genes celulares (Lu, Johnson et al. 1996, Salem, Zhang et al. 2011, Xue, Qiao et al. 2012, Chen, Zhong et al. 2014), por lo que sería posible que se incluyeran en el inóculo o la partícula vírica, como ocurre con diversas proteínas celulares identificados en la composición BV (Wang, Deng et al. 2010). Igualmente, la alteración del patrón temporal de expresión de los factores *Ac-IE0* y *Ac-IE1* en infecciones con el vector TB podría inducir la expresión a tiempos tardíos de factores víricos tempranos, como la proteína *Ac-IE2*, cuyo promotor está regulado por la proteína *Ac-IE1* (Carson, Summers et al. 1991, Ono, Sato et al. 2015) y está implicada en la alteración el ciclo celular en células de insecto (Braunagel, Parr et al. 1998, Prikhod'ko and Miller 1998, Ikeda and Kobayashi 1999), o la proteína LEF-7 que permite al baculovirus modular la DDR celular en favor de la replicación su vADN (Mitchell, Byers et al. 2013). Finalmente y aunque no ha sido objeto de estudio de este trabajo, tampoco es descartable que mediante el *efecto protector* celular del vector TB se estuvieran retradando los procesos necróticos relacionados con las proteínas P10 (Williams, Rohel et al. 1989), quitinasa y catepsina (Hom, Ohkawa et al. 2002, Ishimwe, Hodgson et al. 2015).

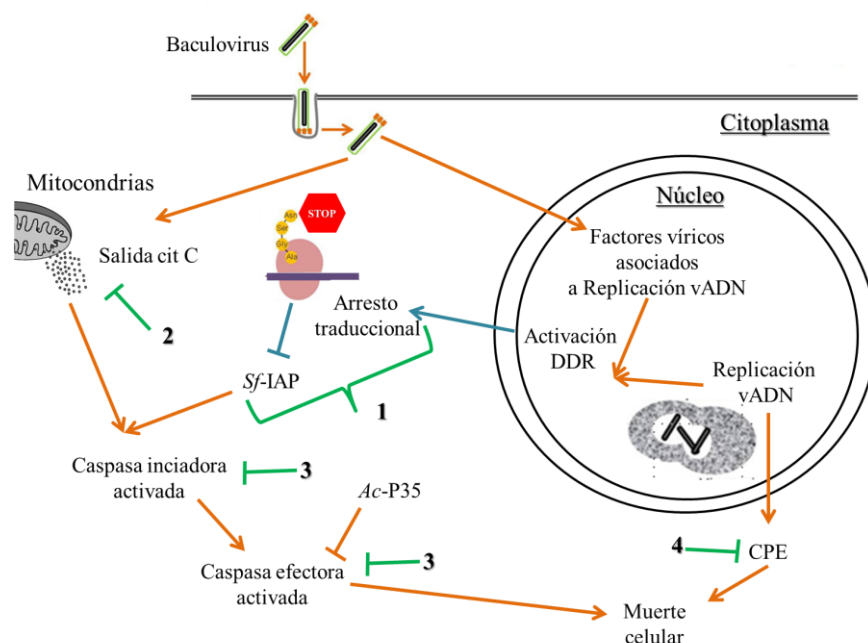


Figura 28: Puntos de acción propuestos para el efecto protector celular del vector TB sobre la célula de insecto infectada

Diagrama representativo de efectos relacionados con la viabilidad celular asociados a la infección de células de insecto con vectores baculovirus (—), donde además se observan las respuestas de defensa activadas por la célula huésped (—) y los posibles puntos de actuación del efecto protector celular durante la infección con el vector TB (—): 1. retraso en la aparición del arresto traduccional global a nivel de apagado génico, concretamente de proteínas relacionadas con la regulación intracelular de la cascada apoptótica (*Sf*-IAP), 2. retraso en la liberación al citoplasma del citocromo C mitocondrial, 3. actividad caspasa (iniciadora y efectora retardada), 4. retardo en la aparición del CPE. Siendo citC citocromo C, DDR respuesta a daño en ADN y CPE efecto citopático. Basado en (Clarke and Clem 2003, Huang, Wu et al. 2011, Liu, Shu et al. 2012, Mitchell and Friesen 2012, Monteiro, Carinhas et al. 2012).

3. Efecto de la infección con el vector TB sobre rutas de proliferación y supervivencia celular

Tanto en trabajos previos del grupo como en esta Tesis, se ha observado que los cultivos infectados con el vector TB mantenían una mayor tasa de crecimiento desde tiempos tempranos (3-6 hpi), representado por el n° de células viables, superior a la mostrada por los cultivos infectados con el vector Convencional, llegando a ser estadísticamente significativa a las 24 y 48 hpi (Figura 16.A). Otros autores han descrito que los baculovirus activan rutas celulares relacionadas con la supervivencia y proliferación celular (Katsuma, Mita et al. 2007, Xiao, Yang et al. 2009, Nguyen, Nielsen et al. 2013). Dada la activación de la ruta regulada por PI3K/Akt en células Sf9 a tiempos muy tempranos de la infección con AcMNPV (2-6 hpi, (Xiao, Yang et al. 2009)), se procedió al análisis del estado de activación de dicha ruta mediante la detección de la forma fosforilada de Akt en nuestros cultivos con células Sf21 en monocapa (Figura 16.B y S-9). De manera similar a lo descrito, a las 2 hpi se hallaron diferencias en la cantidad de Akt activa entre las células infectadas respecto a las control (Xiao, Yang et al. 2009), observándose una mayor cantidad de Akt fosforilada en la muestra infectada con el vector TB que podría explicar las diferencias observadas en el n° de células viables desde tiempos tempranos (Figura 16.A). Es importante mencionar que en otros modelos víricos virus, la activación de la ruta EGF/PI3K/Akt en la célula huésped está relacionada con una regulación positiva de los genes celulares que codifican para el IAP2 celular (Wu,

Wu et al. 2010), pudiendo asociarse con los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis sobre los niveles transcripcionales de *Sf-IAP* y el *efecto protector* de las infecciones con el vector TB.

4. Caracterización del efecto de la sobre-expresión individual de las proteínas Ac-IE0 e IE1 sobre cultivos celulares de insecto

Con el objeto de poder definir la función de la sobre-expresión de cada uno de los factores transactivadores codificados por la secuencia *Ac-ie-01* del vector TB, se construyeron los vectores TB-B y TB-C (Figura S-10). Como las secuencias *Ac-ie-0Δ1* y *Ac-ie-1* también estaban reguladas por el promotor de actividad muy tardía *polh*, el patrón de expresión de las proteínas transactivadoras fue similar al detectado en las muestras infectadas con el vector Convencional a tiempos tempranos (Figura 17.A), correlacionando con los patrones de expresión previamente descritos para estas proteínas (Chisholm and Henner 1988, Kovacs, Guarino et al. 1991, Theilmann and Stewart 1993, Choi and Guarino 1995, Pullen and Friesen 1995, Friesen 1997, Lu, Du et al. 2003), y a partir de las 48 hpi se detectaron alteraciones en el patrón de expresión de las proteínas Ac-IE0 e IE1 (Figura 17.B). Pese a que el vector TB-B sólo sobre-expresaba Ac-IE0, se detectó un patrón prácticamente similar al observado en los extractos infectados con el vector TB, posiblemente debido a la regulación positiva que ejerce el factor Ac-IE0 sobre el promotor *ie1* (Kovacs, Guarino et al. 1991, Ono, Sato et al. 2015) y en ningún caso debido a la expresión de la proteína Ac-IE1 desde el ATG interno presente en la secuencia *Ac-ie-01*, ya que se mutó para su anulación (Huijskens, Li et al. 2004, Stewart, Huijskens et al. 2005, Sokal, Nie et al. 2014), diferencialmente a lo descrito para la expresión de Ac-IE01 en las cepas parentales (silvestres) de AcMNPV y OpMNPV (Theilmann, Willis et al. 2001). Por otro lado, el patrón de expresión de la proteína Ac-IE1 en los extractos infectados con el vector TB-C recordaba a la observada en los infectados con el vector Convencional, aunque en mayor cantidad por la regulación del promotor *polh*, detectándose una mayor acumulación de la proteína Ac-IE1 a tiempos muy tardíos (Pullen and Friesen 1995).

Aunque en cuanto a producción de progenie vírica no se detectaron diferencias significativas al sobre-expresar estos factores transactivadores (Figura 18), sí que se hallaron indicios en cuanto al desarrollo temporal del *efecto protector* descrito anteriormente en este trabajo de Tesis para infecciones con el vector TB. En concreto, se hallaron diferencias estadísticamente significativas en la viabilidad de cultivos Sf9 en suspensión infectados a baja MOI con los vectores Convencional, TB, TB-B y TB-C, siendo mayores los porcentajes de viabilidad de los cultivos infectados con cualquiera de las versiones del vector TB que los de los infectados con el vector Convencional (Figura 19.A). Este fenómeno también se mantuvo al analizar indirectamente la viabilidad de células Sf21 infectadas a alta MOI mediante actividad reductora mitocondrial (Figura 19.B). Sorprendentemente, en ambos ensayos se registraron antes las diferencias en viabilidad respecto a las infecciones con el vector Convencional en los casos en los que se comparaba con cultivos infectados con TB y TB-B, mientras que para alcanzar dicha significancia estadística hubo que esperar 24h más en los infectados con TB-C. Este desfase en la viabilidad de los cultivos infectados con el vector TB-C respecto a los infectados con las versiones TB o TB-B podría estar

relacionado con lo descrito en algunos trabajos que relacionan la expresión de la proteína IE1 y otros factores tempranos con la inducción indirecta de apoptosis (Prihod'ko and Miller 1996, Prihod'ko and Miller 1999, Schultz, Wetter et al. 2009). Además, los datos de este ensayo correlacionaron con las diferencias en el mayor n° de células viables observado a tiempos de 24 y 48 hpi (Figura 20), en los que se observan valores significativamente superiores en los cultivos infectados con los vectores TB o TB-B respecto de los infectados con el vector Convencional e incluso con el vector TB-C. Por tanto, parece que principalmente la sobre-expresión de la proteína *Ac-IE0*, observada en las infecciones con los vectores TB y TB-B, sería determinante en la consecución de una mejor viabilidad de los cultivos infectados y correlacionaría con trabajos previos que mencionan una mejor viabilidad de los cultivos infectados y una ausencia de proteólisis de elementos intracelulares característica de baculovirus cuando rescatan virus mutantes para *Ac-IE0/IE1* con la expresión de la proteína *Ac-IE0* en niveles mayores a los de la proteína *Ac-IE1* (Stewart, Huijskens et al. 2005, Sokal, Nie et al. 2014).

Considerando que la infección con el vector TB permite la expresión de proteínas heterólogas en mayor cantidad y mejor calidad respecto al vector Convencional (Gómez-Sebastián, López-Vidal et al. 2014, Lopez-Vidal 2014, López-Vidal, Gómez-Sebastián et al. 2015), estudiamos el papel de la sobre-expresión de cada factor por separado en la capacidad productiva del vector TB para la proteína modelo GFP (Figura 21). Los extractos procedentes de las infecciones con las diferentes versiones del vector TB presentaron unos niveles muy superiores de expresión de GFP funcional en comparación a los mostrados por los cultivos infectados con el vector Convencional, con independencia de la metodología de cultivo (suspensión (Sf9) o monocapa (Sf21)) o la MOI (alta o baja) empleados (Figuras 21.A y B), asociada a la interacción de las proteínas *Ac-IE0* e *Ac-IE1* con secuencias reguladoras *hr* (Guarino and Summers 1986, Kovacs, Guarino et al. 1991, Ribeiro, Hutchinson et al. 1994, Choi and Guarino 1995, Pearson and Rohrmann 1997, Rodems, Pullen et al. 1997, Theilmann, Willis et al. 2001, Luria, Lu et al. 2012, Sokal, Nie et al. 2014), como la presente en el promotor del vector TB (Gómez-Sebastián, López-Vidal et al. 2014, Lopez-Vidal 2014) y sus versiones. Además, esa mayor expresión de la proteína GFP recombinante obtenida con las diferentes versiones del vector TB correlacionó con una mayor presencia de tubulina intracelular en los extractos proteicos analizados (Figura 21.C), lo que parecería indicar un menor CPE asociado previamente al *efecto protector* del vector TB también en sus otras dos versiones. Adicionalmente, en el caso del extracto procedente de la infección con el vector Convencional, donde se detectó una peor conservación de la tubulina intracelular, también se detectaron formas de plegamiento anómalo de la proteína GFP heteróloga (Figura 21.C). Este resultado concuerda con los trabajos que describen la aparición de proteólisis en el entorno intracelular de los cultivos infectados durante el auge de actividad de los promotores empleados en los vectores convencionales, que ejerce un efecto adverso sobre los niveles de producción y correcta modificación post-traducciona de la proteína recombinante expresada con este sistema (Pyle, Barton et al. 1995, Grosch and Hasilik 1998, Naggie and Bentley 1998, Ikonou, Schneider et al. 2003, Brondyk 2009, van Oers 2011, Contreras-Gómez, Sanchez-Mirón et al. 2014). Por

tanto, ambas versiones del vector TB también son capaces de igualar su capacidad productiva a la par que mantienen el entorno intracelular menos hostil y más íntegro.

5. Validación del vector TB para la expresión de glicoproteínas recombinantes en BEVS

Como siguiente objetivo, se planteó comprobar la capacidad productiva del vector TB para expresar proteínas heterólogas complejas. Considerando el auge y la repercusión de las tecnologías recombinantes en el campo de la producción de vacunas tipo subunidad (Liu, Zhang et al. 2013, Milian and Kamen 2015, Zhang, Zheng et al. 2015), nos centramos en el estudio exhaustivo y comparativo de una glicoproteína de interés sanitario y una proteína estructural de interés veterinario.

5.1. Producción de HA-AIV como glicoproteína modelo de interés

Como modelo de glicoproteína, elegimos la proteína HA del virus Influenza A/H1N1/PR8/34 para ser expresada en infecciones con los vectores Convencional y TB recombinantes. Las proteínas HA pertenecientes distintos subtipos del virus Influenza han sido previamente expresadas mediante vectores baculovirus convencionales, utilizando plataformas productivas tales como larvas de lepidópteros (Kuroda, Groner et al. 1989, Price, Reichelderfer et al. 1989, Sugiura, Sugita et al. 2001, Gomez-Casado, Gomez-Sebastian et al. 2011, Dong, Harada et al. 2013) o cultivos celulares de insecto (Kuroda, Hauser et al. 1986, Possee 1986, Treanor, Schiff et al. 2006, Wang, Holtz et al. 2006, Treanor, Schiff et al. 2007, Feshchenko, Rhodes et al. 2012, Santiago, Lambert Emo et al. 2012, An, Rininger et al. 2013, Margine, Palese et al. 2013), llegando incluso a ser aprobada una vacuna frente al virus de influenza basada en la HA recombinante producida en células de insecto infectadas con un baculovirus convencional (Treanor, Schiff et al. 2006, Cox and Hashimoto 2011, Treanor, Sahly et al. 2011, Felberbaum 2015). En este trabajo de Tesis, se procedió al clonaje del ectodominio de la proteína HA (HA¹⁸⁻⁵²⁹), donde se han localizado sitios antigénicos importantes para la producción de NAb (Caton, Brownlee et al. 1982, Wei, Boyington et al. 2010, Sriwilaijaroen and Suzuki 2012), combinando esta secuencia seleccionada con dos estrategias diferentes para mejorar su producción: el péptido señal de la proteína Melitina (PS-Mel) y el tetrapéptido KDEL. Se eligieron estas dos estrategias puesto que ya habían mostrado su eficacia en la correcta expresión-secreción y acumulación respectivamente de proteínas heterólogas en el sistema BEVS (Tessier, Thomas et al. 1991, Sisk, Bradley et al. 1994, Bozon, Remy et al. 1995, Okamoto, Minamikawa et al. 1999, Kaba, Salcedo et al. 2004, Wu, Gousset et al. 2007, Gomez-Sebastian, Perez-Filgueira et al. 2008, Gomez-Casado, Gomez-Sebastian et al. 2011, Gómez-Sebastián, Nunez et al. 2012, Pecora, Malacari et al. 2015).

5.1.1. Producción de la proteína HA¹⁸⁻⁵²⁹ en conjunción con PS-Mel

Tras la generación de los vectores Convencional y TB que codificaban para la proteína HA¹⁸⁻⁵²⁹ en conjunción con el PS-Mel (Figura S-11.A y B), el primer abordaje que se realizó fue la determinación de los tiempos óptimos de expresión para cada vector en cultivos de células Sf9 en suspensión (Figura 22),

dato importante en este sistema productivo (Possee 1986, Nwe, He et al. 2006, Margine, Palese et al. 2013). Basándonos en consideraciones ya descritas (Palomares, Estrada-Mondaca et al. 2004, Fath-Goodin, Kroemer et al. 2006, Murhammer 2007), establecimos el tiempo óptimo de producción como el tiempo post-infección más cercano a la caída de la viabilidad de los cultivos por debajo del 80% (Figura 22.A) y a la detección del CPE (Figura 22.B). En consonancia con trabajos previos del laboratorio (Gómez-Sebastián, López-Vidal et al. 2014, Lopez-Vidal 2014, López-Vidal, Gómez-Sebastián et al. 2015) y con esta Tesis, el menor CPE desarrollado por los cultivos infectados con el vector TB supuso una ampliación en la ventana de producción de 24 h más respecto al tiempo óptimo de producción de los cultivos infectados por el vector Convencional (72hpi vs 48 hpi, respectivamente) y un incremento de la proteína secretada al medio extracelular de hasta casi 2 veces respecto a la producción llevada a cabo por cultivos infectados con un vector baculovirus convencional. Mediante el uso de vectores que inducen un CPE retardado y, por tanto, mantienen la viabilidad y la integridad de los cultivos infectados durante el transcurso de la infección, otros trabajos también han descrito un aumento de la ventana de expresión de las proteínas heterólogas en el sistema BEVS (Lee, Chen et al. 1998, Possee, Thomas et al. 1999, Ho, Lo et al. 2004, Kaba, Salcedo et al. 2004, Fath-Goodin, Kroemer et al. 2006, Hitchman, Possee et al. 2010).

Seguidamente, se comprobó la cinética de secreción a lo largo de la infección de la proteína HA¹⁸⁻⁵²⁹ expresada en conjunción con el PS-Mel (Figura 23). La detección inmuno-específica de la tubulina intracelular en el medio extracelular como indicador indirecto de la lisis de los cultivos infectados y con ello de un menor CPE (Figura 23.A), permitió discernir que mientras que en los cultivos infectados con el vector Convencional la secreción de la proteína HA¹⁸⁻⁵²⁹ se veía acompañada de la liberación de proteínas intracelulares por la lisis celular tras las 48 hpi, en la infección con el vector TB, este efecto lítico se retrasaba hasta casi 24 h después, mostrando un patrón de secreción más duradero de la forma monomérica (63 kDa aproximadamente) de la proteína HA¹⁸⁻⁵²⁹ (Figura 23 y S-12). En consecuencia, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de la proteína HA¹⁸⁻⁵²⁹ secretada al medio extracelular a los respectivos tiempos óptimos de producción, observándose hasta dos veces más de proteína secretada en infecciones con el vector TB (Figura 23.B), repitiéndose esta tendencia en el modelo *in vivo* donde se detectó mayor cantidad de la proteína HA¹⁸⁻⁵²⁹ secretada a la hemolinfa de larvas infectadas con el vector TB (datos no mostrados). En ambos modelos, este resultado estaría vinculado al mejor estado de la maquinaria intracelular en los cultivos infectados con el vector TB, permitiendo que la maquinaria intracelular implicada en la ruta secretora se mantuviera en las condiciones óptimas durante más tiempo y permitiese el correcto transporte y secreción de la proteína HA¹⁸⁻⁵²⁹ siendo de nuevo observado. Además, estaría directamente relacionado con los resultados descritos por otros autores en los que también se observa una mejora de la secreción de otras proteínas heterólogas expresadas en BEVS al utilizar vectores menos líticos que los convencionales (Lee, Chen et al. 1998, Possee, Thomas et al. 1999, Ho, Lo et al. 2004, Kaba, Salcedo et al. 2004, Fath-Goodin, Kroemer et al. 2006, Hitchman, Possee et al. 2010). No obstante, en ambos casos, la proteína HA¹⁸⁻⁵²⁹ secretada al medio extracelular de los cultivos

infectados con el vector Convencional y TB a sus tiempos óptimos de producción, fue correctamente modificada post-traduccionalmente, como refleja su sensibilidad al tratamiento con la enzima deglicosilasa (Figura 24.A), (Crawford, Wilkinson et al. 1999, Wang, Holtz et al. 2006, Santiago, Lambert Emo et al. 2012, Margine, Palese et al. 2013). Adicionalmente, la proteína HA¹⁸⁻⁵²⁹ secretada en los medios extracelulares de sendos cultivos infectados fue correctamente reconocida mediante ELISA indirecto (Figura 24.B), obteniéndose títulos de 1/1300 para la muestra procedente de la infección con el vector Convencional respecto a 1/5000 para la procedente de la infección con el vector TB. Es importante verificar que la glicoproteína heteróloga expresada haya sido correctamente modificada y plegada, sobre todo si se pretende utilizar como antígeno vacunal. Además, este estudio es importante porque hay trabajos en los que se utiliza la proteína HA liberada al sobrenadante por la lisis celular a tiempos finales de la infección con vectores baculovirus recombinantes (Mueller, Renzullo et al. 2010, Liu, Zhang et al. 2013), sin considerar los posibles efectos contraproducentes a nivel de la calidad del producto expresado (Hearing, Gething et al. 1989, Pyle, Barton et al. 1995, Naggie and Bentley 1998).

Posteriormente, se cuestionó si este mejor rendimiento de secreción con el vector TB se correlacionaría con una mayor producción intracelular respecto a la de las células infectadas con el vector Convencional, tal y como se ha descrito anteriormente para la expresión intracelular de otros modelos como la proteína GFP o diferentes VLPs (Gómez-Sebastián, López-Vidal et al. 2014, Lopez-Vidal 2014, López-Vidal, Gómez-Sebastián et al. 2015), o si más bien estaba relacionado con un tráfico y secreción más eficientes. Al analizar los extractos celulares de sendos cultivos infectados recogidos a los diferentes tiempos post-infección, principalmente se detectaron dos bandas inmuno-específicas para la proteína HA¹⁸⁻⁵²⁹ (Figura S-13.A, HA¹⁸⁻⁵²⁹), que correlacionarían con las formas glicosilada (mayor tamaño) y no glicosilada del monómero de la proteína HA¹⁸⁻⁵²⁹. Sin embargo, a tiempos muy tardíos de la infección (96-120 hpi), se observó la casi total desaparición de la forma glicosilada de la proteína en los cultivos infectados por el vector Convencional, mientras que en los cultivos infectados con el vector TB se siguió detectando el doble bandeo hasta las 96 hpi. Esta observación corroboraría un entorno intracelular mejor preservado en los cultivos infectados con el vector TB respecto a los infectados con el vector Convencional, tal y como se deduce del análisis de la tubulina intracelular (Figura S-13.A, Tubulina). Esta última observación junto con la ausencia de diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de la proteína HA¹⁸⁻⁵²⁹ expresada intracelularmente a los tiempos óptimos de producción (Figura 13.B), sugerían que el mejor rendimiento secretor de la proteína HA¹⁸⁻⁵²⁹, expresada en conjunción con el PS-Mel observado en cultivos infectados con el vector TB, estaría relacionado con una mejor conservación de la maquinaria de translocación proteica. Por tanto, el vector TB en conjunción con el PS-Mel permitía una mayor secreción de la glicoproteína modelo, mostrándose como otra alternativa a los vectores en los que la expresión de la glicoproteína heteróloga está controlada bajo promotores tempranos menos productivos (Chazenbalk and Rapoport 1995, Ishiyama and Ikeda 2010), o a los vectores baculovirus menos líticos para la producción de glicoproteínas y proteínas secretables (Lee, Chen et al. 1998, Possee, Thomas et al.

1999, Ho, Lo et al. 2004, Kaba, Salcedo et al. 2004, Fath-Goodin, Kroemer et al. 2006, Hitchman, Possee et al. 2010).

5.1.2. Producción de la proteína HA¹⁸⁻⁵²⁹KDEL

Siguiendo nuestro objetivo de comprobar la capacidad productiva del vector TB en combinación con distintas estrategias relacionadas con el tráfico proteico que permitiesen mejorar la expresión de glicoproteínas heterólogas en el sistema BEVS, nos cuestionamos si el empleo del tetrapéptido de retención en ER (KDEL) mejoraría la producción de HA¹⁸⁻⁵²⁹ en infecciones celulares. Tras determinar los tiempos óptimos de producción para los cultivos celulares infectados con cada vector (vector Convencional: 48 hpi; vector TB: 72 hpi), donde también se detectó el retardo en la aparición del CPE en los cultivos infectados con el vector TB mediante el mantenimiento de la viabilidad por un periodo de tiempo mayor (Figura 25.A) y la menor lisis celular (Figura 25.B), estudiamos la cinética de expresión intracelular de la proteína HA¹⁸⁻⁵²⁹KDEL (Figura S-14). La proteína fue detectada en su forma monomérica en ambos casos, siendo su expresión algo más sostenida en la infección con el vector TB (Figura S-14.A, HA¹⁸⁻⁵²⁹KDEL), resultado que se explicaría con un mejor mantenimiento de la maquinaria productiva celular al detectarse un entorno intracelular menos lítico (Figura S-14.A, Tubulina). Sin embargo, a sus tiempos óptimos de producción no encontramos diferencias significativas en la cantidad de la proteína HA¹⁸⁻⁵²⁹KDEL expresada en los cultivos infectados con uno u otro vector (Figura S-14.B). Inesperadamente, a los tiempos óptimos de producción se observó que la proteína HA¹⁸⁻⁵²⁹KDEL era detectada extracelularmente en sendos cultivos celulares infectados (Figura 26.A), encontrando evidencias estadísticamente significativas que apoyaban que la liberación de la proteína HA¹⁸⁻⁵²⁹KDEL al medio de las infecciones con el vector TB era 3,5 veces superior respecto a la de las infecciones con el vector Convencional (Figura 26.B). Este resultado se confirmó mediante inmunofluorescencia en células Sf21 infectadas en monocapa, donde se detectó un patrón peri-membranoso para la proteína HA¹⁸⁻⁵²⁹KDEL en las infecciones con ambos vectores, que fue más intenso en la infección con el vector TB (Figura 26.C) y mediante ELISA indirecto (Figura 26.D), pese a no haber detectado diferencias en la producción intracelular de esta proteína. Estas observaciones corroborarían lo observado por otros autores, quienes describieron la secreción de proteínas recombinantes asociadas a KDEL al ser expresadas en diferentes modelos celulares (Zagouras and Rose 1989, Yoshimori, Semba et al. 1990, Biocca, Tafani et al. 1998, Okamoto, Minamikawa et al. 1999, Petruccioli, Otegui et al. 2006), y con aquellos trabajos que han observado una distribución superficial peri-membrana plasmática del receptor de KDEL como resultado de un transporte de proteínas cargo tipo factores neurotróficos con señal tipo KDEL semejante a la secreción (Henderson, Richie et al. 2013). En esta línea, la liberación de la proteína HA¹⁸⁻⁵²⁹ KDEL al medio extracelular en cultivos celulares infectados con el vector TB podría estar asociada a una distribución peri-membrana de proteínas relacionadas con el tráfico proteico, que podría estar vinculado al retardo generalizado en el apagado génico característico de infección con baculovirus, observado

específicamente en este trabajo de Tesis para genes celulares de esta ruta como *receptor KDEL tipo 2-A* (Figura 15).

5.2. Producción de VP60-RHDV como modelo de proteínas formadoras de VLPs

Por último, se quiso comprobar la capacidad del vector TB para producir VLPs, seleccionando para ello el modelo de RHDV, basándonos en la capacidad de su principal proteína de la cápside (VP60) de auto-ensamblarse (Barcena, Verdaguer et al. 2004) y en la oportunidad de establecer un sistema productivo *in vitro*, hasta ahora inexistente (Plummer y Manchester, 2011), para la manufactura del principal antígeno destinado a una potencial vacuna subunidad, el cual ha demostrado previamente su capacidad inmunogénica (Marin, Martin Alonso et al. 1995, Boga, Martin Alonso et al. 1997, Pérez-Filgueira, Resino-Talaván et al. 2007, Abrantes, van der Loo et al. 2012). Siguiendo el mismo abordaje diseñado para la expresión de la otra proteína modelo utilizada en esta Tesis, se construyeron los vectores Convencional y TB recombinantes para la expresión de VP60 (Figura S-15) y se emplearon para infectar células Sf9 a baja MOI, determinando en primera estancia el tiempo óptimo de producción de este modelo proteico en base al mismo criterio de caída de la viabilidad celular anteriormente citado (Figura 27.A). Correlacionando con el resto de resultados observados al expresar diferentes modelos proteicos en esta Tesis, durante la producción de la proteína VP60 también se observó un mantenimiento de la viabilidad de las células infectadas con el vector TB respecto a la mostrada por las células infectadas con el vector Convencional. Además, concordando con los resultados anteriormente descritos tanto en esta Tesis como por otros autores (Pyle, Barton et al. 1995, Cha, Pham et al. 1997, Grosch and Hasilik 1998, Naggie and Bentley 1998, Pham, Naggie et al. 1999, Ikonomou, Schneider et al. 2003, Brondyk 2009, Kato, Kajikawa et al. 2010, Usami, Ishiyama et al. 2010, van Oers 2011, Contreras-Gómez, Sanchez-Mirón et al. 2014), la expresión de la proteína VP60 en las células infectadas con el vector Convencional fue concomitante con el avance del efecto lítico de la replicación vírica, lo que en nuestro ensayo se tradujo en la aparición de formas de mayor tamaño al esperado (60 kDa) (Figura 27.B, Convencional, VP60). Como ejemplificación del ambiente hostil en el que la proteína VP60 estaba siendo producida, se observa la paulatina desaparición de elementos intracelulares como la tubulina citosólica (Figura 27.B Convencional, Tubulina). En cambio, en los extractos celulares procedentes de la infección con el vector TB, se detectaron mayores cantidades de la proteína VP60 presentando su tamaño esperado (Figura 25.B, TB, VP60), así como un mantenimiento del entorno intracelular (Figura 27.B, TB, VP60). Además esta mayor expresión se correlacionó con un mayor n° de VLPs correctamente ensambladas y del mismo tamaño que las producidas durante la infección con el vector Convencional, tal y como se pudo constatar durante el análisis por ME de muestras de VLPs purificadas procedentes de las respectivas infecciones (Figura 27.C). Finalmente y considerando los respectivos tiempos óptimos de producción (72 hpi para el vector Convencional y 96 hpi para el vector TB), pudimos confirmar que las células infectadas con el vector TB eran capaces de producir hasta 4 veces más de proteína VP60 que las células infectadas con el vector Convencional.

Conclusiones

Conclusiones

1. La copia adicional del cADN *Ac-ie-01* presente en el casete TB permite la sobre-expresión de las proteínas *Ac-IE0* y *Ac-IE1* a tiempos tardíos de la infección (48-72 hpi), produciendo una alteración del patrón de expresión temporal de estos transactivadores respecto al patrón mostrado en infecciones con el vector Convencional. Esta sobre-expresión no ejerce un efecto diferencial sobre la producción de la progenie vírica respecto a la del vector parental.
2. La sobre-expresión de las proteínas *Ac-IE0* y *Ac-IE1* no provoca su incorporación aleatoria en la particular vírica durante la morfogénesis de vectores TB. Sin embargo, esto no excluye la posibilidad de que los efectos observados a tiempos tempranos de la infección de células de insecto con vectores TB estén relacionados con la incorporación en partículas víricas de otros factores víricos y/o celulares como consecuencia de la sobre-expresión de los factores transactivadores citados.
3. La sobre-expresión de las proteínas *Ac-IE0* y *Ac-IE1* provoca un retraso en la aparición del efecto citopático típicamente observado en células de insecto infectadas con vectores baculovirus (definido como *efecto protector*). Este retraso de al menos 24 h va acompañado de una mejora general del entorno intracelular, representada por una mayor integridad mitocondrial y de elementos del citoesqueleto, tales como la tubulina.
4. A tiempos tempranos de la infección, los baculovirus modificados por el casete TB ocasionan una menor liberación de citocromo C mitocondrial al citosol en la infección de células de insecto, provocando una menor actividad caspasa y retrasando la activación de la cascada apoptótica respecto a los cultivos celulares infectados con un vector baculovirus convencional.
5. Los baculovirus modificados por el casete TB ocasionan un retardo en el apagado transcripcional del gen celular *Sf-IAP* en las células infectadas respecto a las infecciones con un vector baculovirus convencional, lo que explicaría la menor actividad detectada de la caspasa iniciadora y efectora de la apoptosis. No se encontraron diferencias en la expresión de la proteína vírica anti-apoptótica *Ac-P35* entre vectores Convencionales y vectores TB que pudiesen explicar el *efector protector* celular descrito.
6. Los vectores baculovirus modificados por el casete TB indujeron en células de insecto una mayor activación de la ruta de proliferación y supervivencia regulada por la proteína Akt, lo cual se traduce en un mayor número de células viables presentes en el cultivo infectado.

7. La sobre-expresión de los factores transactivadores *Ac-IE0* y *Ac-IE1* por separado, también induce el citado *efecto protector* celular, así como el aumento del número de células viables en los cultivos celulares de insecto infectados, característicos de infecciones con vectores baculovirus TB. Aunque estas características fueron más notorias cuando se emplearon las versiones del vector TB que sobre-expresan en mayor medida la proteína *Ac-IE0*, indistintamente cualquiera de las versiones del vector TB redundaron en un incremento de producción de la proteína recombinante modelo expresada (GFP) en los cultivos celulares infectados respecto a los infectados por el vector Convencional.
8. Distintas formas de la proteína HA¹⁸⁻⁵²⁹, expresadas en infecciones de células de insecto con vectores baculovirus recombinantes modificados con el casete TB, se secretaron al medio extracelular de forma más eficiente que cuando se expresaron en cultivos celulares infectados con un vector convencional. Ello sugiere que la ruta secretora celular está mucho menos afectada a tiempos tardíos de infección como consecuencia de la sobre-expresión de las proteínas *Ac-IE0* y *Ac-IE1*. Los incrementos de producción de esta proteína obtenidos por los vectores baculovirus TB oscilaron entre 2 y 3,5 veces respecto a los vectores convencionales.
9. La producción de VLPs obtenidas mediante la expresión de la proteína VP60 del RHDV en células de insecto infectadas fue aproximadamente 4 veces superior usando un vector baculovirus modificado con el casete TB respecto a un baculovirus recombinante convencional. La conformación de las VLPs (forma y tamaño) fue idéntica usando ambos baculovirus.

Bibliografía

Abdelwahid, E., S. Rolland, X. Teng, B. Conradt, J. M. Hardwick and K. White (2011). "Mitochondrial involvement in cell death of non-mammalian eukaryotes." Biochimica et Biophysica Acta **1813**(4): 597–607.

Abdelwahid, E., T. Yokokura, R. J. Krieser, S. Balasundaram, W. H. Fowle and K. White (2007). "Mitochondrial Disruption in *Drosophila* Apoptosis." Developmental Cell **12**: 793–806.

Abrantes, J., W. van der Loo, J. Le Pendu and P. J. Esteves (2012). "Rabbit haemorrhagic disease (RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV): a review." Veterinary Research **43**: 12.

Ahmad, S., S. M. Srinivasula, L. Wang, G. Litwack, T. Fernandes-Alnemri and E. S. Alnemri (1997). "*Spodoptera frugiperda* Caspase-1, a novel insect death protease that cleaves the nuclear immunophilin FKBP46, is the target of the baculovirus anti-apoptotic protein p35." The Journal of Biological Chemistry **272**(3): 1421–1424.

Ailor, E. and M. J. Betenbaugh (1999). "Modifying secretion and post-translational processing in insect cells." Current Opinion in Biotechnology **10**(2): 142-145.

Ailor, E., J. Pathmanathan, J. D. Jongbloed and M. J. Betenbaugh (1999). "A bacterial signal peptidase enhances processing of a recombinant single chain antibody fragment in insect cells." Biochemical and Biophysical Research Communications **255**(2): 444-450.

Alcamí, A., J. Alcamí, R. Alemany, J. M. Almendral, A. Angulo, J. Benavente, F. X. Bosch, J. A. Bueren, L. Carrasco, A. L. Carrascosa, J. L. Carrascosa, I. Casal, J. Díez, J. M. Echevarría, L. Enjuanes, C. Escarmís, M. Esteban, E. Feduchi, R. Fernandez-Muñoz, R. Flores, M. Gasset, M. E. González, A. Irurzun, J. M. Martínez, J. A. Melero, A. Muñoz, J. Ortín, M. A. Pajares, J. C. Ramírez, A. Portela, S. Ramón y Cajal, Y. Revilla, J. Ruiz-Castón, A. Talavera and L. Valenciano (2006). *Orthomyxoviridae. Virus Patógenos*. E. Feduchi and A. Irurzun. Madrid, Editorial Hélyce-Fundación BBVA: 377-392.

Alnemri, E. S., N. M. Robertson, T. F. Fernandes, C. M. Croce and G. Litwack (1992). "Over-expressed full-length human BCL2 extends the survival of baculovirus-infected Sf9 insect cells." Proceedings of the National Academy of Sciences **89**(16): 7295-7299.

An, Y., J. A. Rininger, D. L. Jarvis, X. Jing, Z. Ye, J. J. Aumiller, M. Eichelberger and J. F. Cipollo (2013). "Comparative Glycomics Analysis of Influenza Hemagglutinin (H5n1) Produced in Vaccine Relevant Cell Platforms." Journal of Proteome Research **12**(8): 3707-3720.

Ardisson-Araujo, D. M., J. R. Rocha, M. H. da Costa, A. L. Bocca, A. N. Dusi, R. de Oliveira Resende and B. M. Ribeiro (2013). "A baculovirus-mediated strategy for full-length plant virus coat protein expression and purification." Virology Journal **10**: 262.

Arif, B. M., B. C. Bonning, D. A. Theilmann, E. A. Herniou, G. W. Blissard, J. J. Becnel, J. A. Jehle and R. Harrison (2011). Baculoviridae. Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. A. M. Q. King, M. J. Adams, E. B. Carstens and E. J. Lefkowitz. Oxford, Elsevier: 163-174.

Au, S., W. Wu and N. Panté (2013). "Baculovirus Nuclear Import: Open, Nuclear Pore Complex (NPC) Sesame." Viruses **5**: 1885-1900.

Ayres, M. D., S. C. Howard, J. Kuzio, M. Lopez-Ferber and R. D. Possee (1994). "The complete DNA sequence of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus." Virology **202**(2): 586-605.

Barcena, J. and E. Blanco (2013). "Design of Novel Vaccines Based on Virus-Like Particles or Chimeric Virions." Subcellular Biochemistry **68**: 631-665.

Barcena, J., N. Verdaguer, R. Roca, M. Morales, I. Angulo, C. Risco, J. L. Carrascosa, J. M. Torres and J. R. Caston (2004). "The coat protein of Rabbit hemorrhagic disease virus contains a molecular switch at the N-terminal region facing the inner surface of the capsid." Virology **322**(1): 118-134.

Barderas, M. G., A. Wigdorovitz, F. Merelo, F. Beitia, C. Alonso, M. V. Borca and J. M. Escribano (2000). "Serodiagnosis of African swine fever using the recombinant protein p30 expressed in insect larvae." Journal of Virology Methods **89**: 129-136.

Berthelet, J. and L. Dubrez (2013). "Regulation of Apoptosis by Inhibitors of Apoptosis (IAPs)." Cells **2**: 163-187.

Bertin, J., S. M. Mendrysa, D. J. LaCount, S. Gaur, J. F. Krebs, R. C. Armstrong, K. J. Tomaselli and P. D. Friesen (1996). "Apoptotic suppression by baculovirus P35 involves cleavage by and inhibition of a virus-induced CED-3/ICE-like protease." Journal of Virology **70**(9): 6251-6259.

Best, S. M. (2008). "Viral Subversion of Apoptotic Enzymes: Escape from Death Row." Annual Review of Microbiology **62**: 171-192.

Beyer, T., M. Herrmann, C. Reiser, W. Bertling and J. Hess (2001). "Bacterial carriers and virus-like-particles as antigen delivery devices: role of dendritic cells in antigen presentation." Curr Drug Targets Infect Disord **1**(3): 287-302.

Bill, R. M. and T. von der Haar (2015). "Hijacked then lost in translation: the plight of the recombinant host cell in membrane protein structural biology projects." Current Opinion in Structural Biology **32**: 147-155.

Biocca, S., M. Tafani and A. Cattaneo (1998). "Assembled IgG molecules are exported from the endoplasmic reticulum in myeloma cells despite the retention signal SEKDEL." Biochemical and Biophysical Research Communications **246**(2): 518-523.

Birnbaum, M. J., R. J. Clem and L. K. Miller (1994). "An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs." Journal of Virology **68**(4): 2521-2528.

Birnboim, H. C. and J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic Acids Research **7**: 1513-1523.

Blissard, G. W. (1996). "Baculovirus--insect cell interactions." Cytotechnology **20**(1-3): 73-93.

Blissard, G. W. and G. F. Rohrmann (1990). "Baculovirus Diversity and Molecular Biology." Annual Review of Entomology **35**: 127-155.

Blissard, G. W. and J. R. Wenz (1992). "Baculovirus gp64 Envelope Glycoprotein Is Sufficient To Mediate pH-Dependent Membrane Fusion." Journal of Virology **66**(11): 6829-6835.

Boga, J. A., J. M. Martin Alonso, R. Casais and F. Parra (1997). "A single dose immunization with rabbit haemorrhagic disease virus major capsid protein produced in *Saccharomyces cerevisiae* induces protection." Journal of General Virology **78** (Pt 9): 2315-2318.

Bonning, B. C. and T. Nusawardani (2007). Introduction to the Use of Baculoviruses as Biological Insecticides. Baculovirus and Insect Cell Expression Protocols D. W. Murhammer. Totawa, NJ, Humana Press. **338**: 356-366.

Bossy-Wetzel, E., D. D. Newmeyer and D. R. Green (1998). "Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization." The EMBO Journal **17**(1): 37-49.

Bozon, V., J. J. Remy, E. Pajot-Augy, L. Couture, G. Biache, M. Severini and R. Salesse (1995). "Influence of promoter and signal peptide on the expression and secretion of recombinant porcine LH extracellular domain in baculovirus/lepidopteran cells or the caterpillar system." Journal of Molecular Endocrinology **14**(3): 277-284.

Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Analytical Biochemistry **72**: 248-254.

Braunagel, S., P. Parr, M. Belyavskiy and M. D. Summers (1998). "Autographa californica Nucleopolyhedrovirus Infection Results in Sf9 Cell Cycle Arrest at G2/M Phase." Virology **244**: 195-211.

Braunagel, S. C., W. K. Russell, G. Rosas-Acosta, D. H. Russell and M. D. Summers (2003). "Determination of the protein composition of the occlusion-derived virus of Autographa californica nucleopolyhedrovirus." Proceedings of the National Academy of Sciences **100**(17): 9797-9802.

Brondyk, W. H. (2009). "Selecting an appropriate method for expressing a recombinant protein." Methods in Enzymology **463**: 131-147.

Bryant, B., Y. Zhang, C. Zhang, C. P. Santos, R. J. Clem and L. Zhou (2009). "A Lepidopteran orthologue of *reaper* reveals functional conservation and evolution of IAP antagonists." Insect Molecular Biology **18**(3): 341-351.

Buckland, B., R. Boulanger, M. Fino, I. Srivastava, K. Holtz, N. Khramtsov, C. McPherson, J. Meghrou, P. Kubera and M. M. Cox (2014). "Technology transfer and scale-up of the Flublok® recombinant hemagglutinin (HA) influenza vaccine manufacturing process." Vaccine **32**(42): 5496-5502.

Cann, A. J. (2005). Pathogenesis. San Diego, USA, Elsevier Inc.: 208-248.

Carbonell, L. F. and L. K. Miller (1987). "Baculovirus interaction with nontarget organisms: a virus-borne reporter gene is not expressed in two mammalian cell lines." Applied and Environmental Microbiology **53**(7): 1412-1417.

Carinhas, N., A. M. Robitaille, S. Suzette Moes, M. Jose, R. Oliveira and P. M. Alves (2011). "Quantitative Proteomics of *Spodoptera frugiperda* Cells during Growth and Baculovirus Infection." PlosOne **6**(10): e26444.

Carpes, M. P., M. E. de Castro, E. F. Soares, A. G. Villela, F. J. Pinedo and B. M. Ribeiro (2005). "The inhibitor of apoptosis gene (*iap-3*) of *Anticarsia gemmatilis* multicapsid nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) encodes a functional IAP." Archives of Virology **150**(8): 1549-1562.

Carson, D. D., M. D. Summers and L. A. Guarino (1991). "Transient expression of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus immediate-early gene, IE-N, is regulated by three viral elements." Journal of Virology **65**(2): 945-951.

Cartier, J. L., P. A. Hershberger and P. D. Friesen (1994). "Suppression of apoptosis in insect cells stably transfected with baculovirus p35: dominant interference by N-terminal sequences p35(1-76)." Journal of Virology **68**(12): 7728-7737.

Caton, A. J., G. G. Brownlee, J. W. Yewdell and W. Gerhard (1982). "The Antigenic Structure of the Influenza Virus A/PR/8/34 Hemagglutinin (HI Subtype)." Cell **31**(2 Pt 1): 417-427.

Cerio, R. J., R. Vandergaast and P. D. Friesen (2010). "Host Insect Inhibitor-of-Apoptosis SfiAP Functionally Replaces Baculovirus IAP but Is Differentially Regulated by Its N-Terminal Leader." Journal of Virology **84**(21): 11448–11460.

Cimprich, K. A. and D. Cortez (2008). "ATR: an essential regulator of genome integrity." Nature Reviews Molecular Cell Biology **9**(8): 616-627.

Clarke, T. E. and R. J. Clem (2003). "Insect defenses against virus infection: the role of apoptosis." International Reviews of Immunology **22**(5-6): 401-424.

Clem, R. J. (1997). Regulation Of Programmed Cell Death By Baculoviruses. The Baculoviruses. L. K. Miller. New York, Plenum Press: 237-266.

Clem, R. J. (2001). "Baculoviruses and apoptosis: the good, the bad, and the ugly." Cell Death and Differentiation **8**(2): 137-143.

Clem, R. J. (2005). "The role of apoptosis in defense against baculovirus infection in insects." Current Topics in Microbiology and Immunology **289**: 113-129.

Clem, R. J. (2007). "Baculoviruses and apoptosis: a diversity of genes and responses." Current Drug Targets **8**(10): 1069-1074.

Clem, R. J. and C. S. Duckett (1997). "The *iap* genes: unique arbitrators of cell death." Trends in Cell Biology **7**(9): 337-339.

Clem, R. J., M. Fechheimer and L. K. Miller (1991). "Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells." Science **254**: 1388–1390.

Clem, R. J. and L. K. Miller (1993). "Apoptosis Reduces Both The In Vitro Replication And De Vivo Infectivity Of Baculovirus." Journal of Virology **67**: 3730-3738.

Clem, R. J. and L. K. Miller (1994). "Control of programmed cell death by the baculovirus genes *p35* and *iap*." Molecular and Cellular Biology **14**(8): 5212-5222.

Clemens, M. J. (2005). "Translational control in virus-infected cells: models for cellular stress responses." Semin Cell Dev Biol **16**(1): 13-20.

Cochran, M. A. and P. Faulkner (1983). "Location of Homologous DNA Sequences Interspersed at Five Regions in the Baculovirus AcMNPV Genome." Journal of Virology **45**(3): 961-970.

Contreras-Gómez, A., A. Sanchez-Mirón, F. García-Camacho and E. Molina-Grima (2014). "Protein Production Using the Baculovirus-Insect Cell Expression System." Biotechnology Progress **30**.

Cooper, D. M., D. J. Granville and C. Lowenberger (2009). "The insect caspases." Apoptosis **14**(3): 247-256.

Cooray, S. (2004). "The pivotal role of phosphatidylinositol 3-kinase–Akt signal transduction in virus survival." Journal of General Virology **85**: 1065–1076.

Cory, A. H., T. C. Owen, J. A. Barltrop and J. G. Cory (1991). "Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture." Cancer Commun **3**(7): 207-212.

Courtiade, J., Y. Pauchet, H. Vogel and D. G. Heckel (2011). "A comprehensive characterization of the caspase gene family in insects from the order Lepidoptera." BMC Genomics **12**: 357.

Cox, M. M. (2012). "Recombinant protein vaccines produced in insect cells." Vaccine **30**(10): 1759-1766.

Cox, M. M. (2012). "Recombinant protein vaccines produced in insect cells." Vaccine: 1759–1766.

Cox, M. M. and D. K. Anderson (2006). "Production of a novel influenza vaccine using insect cells: protection against drifted strains." Influenza and Other Respiratory Viruses **1**: 35-40.

Cox, M. M. and Y. Hashimoto (2011). "A fast track influenza virus vaccine produced in insect cells." Journal of Invertebrate Pathology **107**: S31–S41.

Crawford, A. M. and L. K. Miller (1988). "Characterization of an Early Gene Accelerating Expression of Late Genes of the Baculovirus *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus." Journal of Virology **62**(8): 2773-2781.

Crawford, J., B. Wilkinson, A. Vosnesensky, G. Smith, M. Garcia, H. Stone and M. L. Perdue (1999). "Baculovirus-derived hemagglutinin vaccines protect against lethal influenza infections by avian H5 and H7 subtypes." Vaccine **17**(18): 2265-2274.

Crisci, E., H. Almanza, I. Mena, L. Cordoba, E. Gomez-Casado, J. R. Caston, L. Fraile, J. Barcena and M. Montoya (2009). "Chimeric calicivirus-like particles elicit protective anti-viral cytotoxic responses without adjuvant." Virology **387**(2): 303-312.

Crisci, E., L. Fraile, N. Moreno, E. Blanco, R. Cabezon, C. Costa, T. Mussa, M. Baratelli, P. Martinez-Orellana, L. Ganges, J. Martinez, J. Barcena and M. Montoya (2012). "Chimeric calicivirus-like particles elicit specific immune responses in pigs." Vaccine **30**(14): 2427-2439.

Crook, N. E., R. J. Clem and L. K. Miller (1993). "An Apoptosis-Inhibiting Baculovirus Gene with a Zinc Finger-Like Motif." Journal Of Virology **67**(4): 2168-2174.

Cha, H. J., M. Q. Pham, G. Rao and W. E. Bentley (1997). "Expression of Green Fluorescent Protein in Insect Larvae and its Application for Heterologous Protein Production." Biotechnology and Bioengineering **56**(3): 239-247.

Chandna, S., S. Suman, M. Chandna, A. Pandey, V. Singh, A. Kumar, B. S. Dwarakanath and R. K. Seth (2013). "Radioresistant Sf9 insect cells undergo an atypical form of Bax-dependent apoptosis at very high doses of γ -radiation." International Journal of Radiation Biology **89**(12): 1017-1027.

Chaurushiya, M. S. and M. D. Weitzman (2009). "Viral manipulation of DNA repair and cell cycle checkpoints." DNA Repair **8**(9): 1166-1176.

Chazenbalk, G. D. and B. Rapoport (1995). "Expression of the Extracellular Domain of the Thyrotropin Receptor in the Baculovirus System Using a Promoter Active Earlier than the Polyhedrin Promoter. Implications for the Expression of Functional Highly Glycosylated Proteins." The Journal of Biological Chemistry **270**(4): 1543-1549.

Cheever, M. A. and C. S. Higano (2011). "PROVENGE (Sipuleucel-T) in Prostate Cancer: The First FDA-Approved Therapeutic Cancer Vaccine." Clinical Cancer Research **17**(11): 3520-3526.

Chen, L., W. Shen, Y. Wu, B. Li, C. Gong and W. Wang (2009). "The transgenic BmN cells with polyhedrin gene: a potential way to improve the recombinant baculovirus infection per os to insect larvae." Applied Biochemistry and Biotechnology **158**(2): 277-284.

Chen, P., Y. F. Hu, L. Wang, W. F. Xiao, X. Y. Bao, C. Pan, H. S. Yi, X. Y. Chen, M. H. Pan and C. Lu (2015). "Mitochondrial Apoptotic Pathway Is Activated by H₂O₂-Mediated Oxidative Stress in BmN-SWU1 Cells from *Bombyx mori* Ovary." PLoS One **10**(7): e0134694.

Chen, Y., B. Yao, Z. Zhu, Y. Yi, X. Lin, Z. Zhang and G. Shen (2004). "A constitutive super-enhancer: homologous region 3 of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus." Biochemical and Biophysical Research Communications **318**(4): 1039-1044.

Chen, Y. R., S. Zhong, Z. Fei, S. Gao, S. Zhang, Z. Li, P. Wang and G. W. Blissard (2014). "Transcriptome Responses of the Host *Trichoplusia ni* to Infection by the Baculovirus *Autographa californica* Multiple Nucleopolyhedrovirus." Journal of Virology **88**(23): 3781–13797.

Chen, Y. R., S. Zhong, Z. Fei, Y. Hashimoto, J. Z. Xiang, S. Zhang and G. W. Blissard (2013). "The Transcriptome of the Baculovirus *Autographa californica* Multiple Nucleopolyhedrovirus in *Trichoplusia ni* Cells." Journal of Virology **87**(11): 6391.

Chisholm, G. E. and D. J. Henner (1988). "Multiple early transcripts and splicing of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus IE-1 gene." Journal of Virology **62**(9): 3193-3200.

Choi, J. and L. A. Guarino (1995). "The Baculovirus Transactivator IE1 Binds to Viral Enhancer Elements in the Absence of Insect Cell Factors." Journal of Virology **69**(7): 4548–4551.

Choi, J. and L. A. Guarino (1995). "Expression of the IE1 transactivator of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus during viral infection." Virology **209**(1): 99-107.

Chowdhury, I., B. Tharakan and G. K. Bhat (2008). "Caspases - an update." Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol **151**(1): 10-27.

Dai, X., L. G. Willis, I. Huijskens, S. R. Palli and D. A. Theilmann (2004). "The acidic activation domains of the baculovirus transactivators IE1 and IE0 are functional for transcriptional activation in both insect and mammalian cells." Journal of General Virology **85**(Pt 3): 573-582.

Dalrymple, M. A., D. J. McGeoch, A. J. Davison and C. M. Preston (1985). "DNA sequence of the herpes simplex virus type 1 gene whose product is responsible for transcriptional activation of immediate early promoters." Nucleic Acids Research **13**(21): 7865-7879.

Dalton, K. P., J. Abrantes, A. M. Lopes, I. Nicieza, A. L. Alvarez, P. J. Esteves and F. Parra (2015). "Complete genome sequence of two rabbit hemorrhagic disease virus variant b isolates detected on the Iberian Peninsula." Archives of Virology **160**(3): 877-881.

Dalton, K. P., I. Nicieza, J. Abrantes, P. J. Esteves and F. Parra (2014). "Spread of new variant RHDV in domestic rabbits on the Iberian Peninsula." Veterinary Microbiology **169**(1-2): 67-73.

Desagher, S. and J. C. Martinou (2000). "Mitochondria as the central control point of apoptosis." Trends Cell Biology **10**(9): 369-377.

Deveraux, Q. L., N. Roy, H. R. Stennicke, T. V. Arsdale, Q. Zhou, S. M. Srinivasula, E. S. Alnemri, G. S. Salvesen and J. C. Reed (1998). "IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases." The EMBO Journal **17**(8): 2215–2223.

Diehl, N. and H. Schaal (2013). "Make yourself at home: viral hijacking of the PI3K/Akt signaling pathway." Viruses **5**(12): 3192-3212.

Dong, J., M. Harada, S. Yoshida, Y. Kato, A. Murakawa, M. Ogata, T. Kato, T. Usui and E. Y. Park (2013). "Expression and purification of bioactive hemagglutinin protein of highly pathogenic avian influenza A (H5N1) in silkworm larvae." Journal of Virological Methods **194**(1-2): 271-276.

Dorstyn, L., S. Read, D. Cakouros, J. R. Huh, B. A. Hay and S. Kumar (2002). "The role of cytochrome *c* in caspase activation in *Drosophila melanogaster* cells." The Journal of Cell Biology **156**(6): 1089-1098.

Du, X. and S. M. Thiem (1997). "Responses of insect cells to baculovirus infection: protein synthesis shutdown and apoptosis." Journal of Virology **71**(10): 7866-7872.

Dudognon, B., L. Romero-Santacreu, S. Gomez-Sebastian, A. B. Hidalgo, J. Lopez-Vidal, M. L. Bellido, E. Munoz and J. M. Escribano (2014). "Production of functional active human growth factors in insects used as living biofactories." Journal of Biotechnology **184**: 229-239.

Fang, M., Y. Nie and D. A. Theilmann (2009). "AcMNPV EXON0 (AC141) which is required for the efficient egress of budded virus nucleocapsids interacts with β -tubulin." Virology **385**(2): 496-504.

Fath-Goodin, A., J. Kroemer, S. Martin, K. Reeves and B. A. Webb (2006). "Polydnavirus genes that enhance the baculovirus expression vector system." Advances in Virus Research **68**: 75-90.

Fay, N. and N. Pante (2015). "Nuclear entry of DNA viruses." Frontiers in Microbiology **6**: 467.

Felberbaum, R. S. (2015). "The baculovirus expression vector system: A commercial manufacturing platform for viral vaccines and gene therapy vectors." Biotechnology Journal **10**.

Ferrelli, M. L., M. F. Berretta, M. N. Belaich, P. G. Ghiringhelli, A. Sciocco-Cap and V. Romanowski (2012). The Baculoviral Genome. Viral Genomes- Molecular Structure, Diversity, Gene Expression Mechanism and Host-Virus Interactions. M. L. Garcia and V. Romanowski. Croacia, InTech: 3-32.

Feshchenko, E., D. G. Rhodes, R. Felberbaum, C. McPherson, J. A. Rininger, P. Post and M. M. Cox (2012). "Pandemic influenza vaccine: characterization of A/California/07/2009 (H1N1) recombinant hemagglutinin protein and insights into H1N1 antigen stability." BMC Biotechnology **12**: 77.

Forsythe, I. J., C. E. Shippam, L. G. Willis, S. Stewart, T. Grigliatti and D. A. Theilmann (1998). "Characterization of the acidic domain of the IE1 regulatory protein from *Orgyia pseudotsugata* multicapsid nucleopolyhedrovirus." Virology **252**(1): 65-81.

Fraser, A. G. and G. I. Evan (1997). "Identification of a *Drosophila melanogaster* ICE/CED-3-related protease, drICE." The EMBO Journal **16**(10): 2805-2813.

Fraser, A. G., N. J. McCarthy and G. I. Evan (1997). "drICE is an essential caspase required for apoptotic activity in *Drosophila* cells." The EMBO Journal **16**(20): 6192-6199.

Friesen, P. D. (1997). Regulation of Baculovirus Early Gene Expression. The Baculovirus. L. K. Miller. New York, Plenum Press: 141-170.

Friesen, P. D. and L. K. Miller (1987). "Divergent transcription of early 35- and 94-kilodalton protein genes encoded by the HindIII K genome fragment of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus." Journal of Virology **61**(7): 2264-2272.

Fuchs, L. Y., M. S. Woods and R. F. Weaver (1983). "Viral Transcription During *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus Infection: a Novel RNA Polymerase Induced in Infected *Spodoptera frugiperda* Cells." Journal of Virology **48**(3): 641-646.

Futatsumori-Sugai, M. and K. Tsumoto (2010). "Signal peptide design for improving recombinant protein secretion in the baculovirus expression vector system." Biochemical and Biophysical Research Communications **391**(1): 931-935.

Galluzzi, L., C. Brenner, E. Morselli, Z. Touat and G. Kroemer (2008). "Viral control of mitochondrial apoptosis." PLoS Pathog **4**(5): e1000018.

Gao, H., Y. Wang, N. Li, W. P. Peng, Y. Sun, G. Z. Tong and H. J. Qiu (2007). "Efficient gene delivery into mammalian cells mediated by a recombinant baculovirus containing a whispovirus iel promoter, a novel shuttle promoter between insect cells and mammalian cells." Journal of Biotechnology **131**(2): 138-143.

Garnier, L., C. Cahoreau, G. Devauchelle and M. Cerutti (1995). "The Intracellular Domain of the Rabbit Prolactin Receptor is Able to Promote the Secretion of a Passenger Protein via an Unusual Secretory Pathway in Lepidopteran Cells." Biotechnology (N Y) **13**(10): 1101-1104.

Gil, F., M. Pérez-Filgueira, M. G. Barderas, C. Pastor-Vargas, C. Alonso, F. Vivanco and J. M. Escribano (2011). "Targeting antigens to an invariant epitope of the MHC Class II DR molecule potentiates the immune response to subunit vaccines." Virus Research **155**(1): 55-60.

Glocker, B., R. R. Hoopes, Jr., L. Hodges and G. F. Rohrmann (1993). "In Vitro Transcription from Baculovirus Late Gene Promoters: Accurate mRNA Initiation by Nuclear Extracts Prepared from Infected *Spodoptera frugiperda* Cells." Journal of Virology **67**(7): 3771-3776.

Gomez-Casado, E., S. Gomez-Sebastian, M. C. Nunez, R. Lasa-Covarrubias, S. Martínez-Pulgarín and J. M. Escribano (2011). "Insect larvae biofactories as a platform for influenza vaccine production." Protein Expression and Purification.

Gómez-Sebastián, S., J. López-Vidal and J. M. Escribano (2014). "Significant Productivity Improvement of the Baculovirus Expression Vector System by Engineering a Novel Expression Cassette." Plos One **9**(5): e96562.

Gómez-Sebastián, S., M. C. Nunez, L. Garaicoechea, C. Alvarado, M. Mozgovej, R. Lasa, A. Kahl, A. Wigdorovitz, V. Parreno and J. M. Escribano (2012). "Rotavirus A-specific single-domain antibodies produced in baculovirus-infected insect larvae are protective in vivo." BMC Biotechnol **12**: 59.

Gomez-Sebastian, S., D. M. Perez-Filgueira, E. Gomez-Casado, M. C. Nunez, I. Sanchez-Ramos, E. Tabares and J. M. Escribano (2008). "DIVA diagnostic of Aujeszky's disease using an insect-derived virus glycoprotein E." Journal of Virological Methods **153**(1): 29-35.

Griffiths, C. M., A. L. Barnett, M. D. Ayres, J. Windass, L. A. King and R. D. Possee (1999). "In vitro host range of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus recombinants lacking functional *p35*, *iap1* or *iap2*." Journal of General Virology **80**: 1055–1066.

Grosch, H. W. and A. Hasilik (1998). "Protection of proteolysis-prone recombinant proteins in baculovirus expression systems." Biotechniques **24**(6): 930-932, 934.

Gula, M. A., P. L. Buller and R. F. Weaver (1981). "α-Amanitin-Resistant Viral RNA Synthesis in Nuclei Isolated from Nuclear Polyhedrosis Virus-Infected *Heliothis zea* Larvae and *Spodoptera frugiperda* Cells." Journal of Virology **38**(3): 916-921.

Guarino, L. A. and W. Dong (1991). "Expression of an Enhancer-Binding Protein in Insect Cells Transfected with the *Autographa Californica* Nuclear Polyhedrosis Virus Ie1 Gene." Journal of Virology **65**(7): 3676-3680.

Guarino, L. A., M. A. Gonzalez and M. D. Summers (1986). "Complete Sequence and Enhancer Function of the Homologous DNA Regions of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus." Journal of Virology **60**(1): 224-229.

Guarino, L. A. and M. D. Summers (1986). "Functional mapping of a trans-activating gene required for expression of a baculovirus delayed-early gene." Journal of Virology **57**(2): 563-571.

Guarino, L. A. and M. D. Summers (1986). "Interspersed homologous DNA of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus enhances delayed-early gene expression." JOURNAL OF VIROLOGY **60**(1): 215-223.

Habib, S. and S. E. Hasnain (2000). "Differential activity of two non-hr origins during replication of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome." Journal of Virology **74**(11): 5182-5189.

Hacker, G. (2000). "The morphology of apoptosis." Cell and Tissue Research **301**(1): 5-17.

Hajos, J. P., J. Pijnenburg, M. Usmany, D. Zuidema, P. Zavodszky and J. M. Vlak (2000). "High frequency recombination between homologous baculoviruses in cell culture." Archives of Virology **145**(1): 159-164.

Harrison, R. L. and D. L. Jarvis (2006). "PROTEIN N-GLYCOSYLATION IN THE BACULOVIRUS-INSECT CELL EXPRESSION SYSTEM AND ENGINEERING OF INSECT CELLS TO PRODUCE "MAMMALIANIZED" RECOMBINANT GLYCOPROTEINS." ADVANCES IN VIRUS RESEARCH **68**: 159-191.

Hawtin, R. E., T. Zarkowska, K. Arnold, C. J. Thomas, G. W. Gooday, L. A. King, J. A. Kuzio and R. D. Possee (1997). "Liquefaction of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus-infected insects is dependent on the integrity of virus-encoded chitinase and cathepsin genes." Virology **238**(2): 243-253.

Hay, S. and G. Kannourakis (2002). "A time to kill: viral manipulation of the cell death program." Journal of General Virology **83**(7): 1547-1564.

Hearing, J., M. J. Gething and J. Sambrook (1989). "Addition of truncated oligosaccharides to influenza virus hemagglutinin results in its temperature-conditional cell-surface expression." J Cell Biol **108**(2): 355-365.

Hefferon, K. L. and L. K. Miller (2002). "Reconstructing the replication complex of AcMNPV." European Journal of Biochemistry/FEBS **269**(24): 6233-6240.

Hefferon, K. L., A. G. Oomens, S. A. Monsma, C. M. Finnerty and G. W. Blissard (1999). "Host cell receptor binding by baculovirus GP64 and kinetics of virion entry." Virology **258**(2): 455-468.

Heine, J. W., R. W. Honess, E. Cassai and B. Roizman (1974). "Proteins specified by herpes simplex virus. XII. The virion polypeptides of type 1 strains." Journal of Virology **14**(3): 640-651.

Henderson, M. J., C. T. Richie, M. Airavaara, Y. Wang and B. K. Harvey (2013). "Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor (MANF) secretion and cell surface binding are modulated by KDEL receptors." The Journal of Biological Chemistry **288**(6): 4209-4225.

Hershberger, P. A., J. A. Dickson and P. D. Friesen (1992). "Site-specific mutagenesis of the 35-kilodalton protein gene encoded by *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: cell line-specific effects on virus replication." Journal of Virology **66**(9): 5525-5533.

Hershberger, P. A., D. J. LaCount and P. D. Friesen (1994). "The Apoptotic Suppressor P35 Is Required Early during Baculovirus Replication and Is Targeted to the Cytosol of Infected Cells." JOURNAL OF VIROLOGY **68**(4): 3467-3477.

Higgins, M. K., M. Demir and C. G. Tate (2003). "Calnexin co-expression and the use of weaker promoters increase the expression of correctly assembled Shaker potassium channel in insect cells." Biochimica et Biophysica Acta **1610**(1): 124-132.

Hitchman, R. B., E. Locanto, R. D. Possee and L. A. King (2011). "Optimizing the baculovirus expression vector system." Methods **55**(1): 52-57.

Hitchman, R. B., R. D. Possee and L. A. King (2009). "Baculovirus Expression Systems for Recombinant Protein Production in Insect Cells." Recent Patents on Biotechnology **3**(1): 46-54.

Hitchman, R. B., R. D. Possee, E. Siaterli, K. S. Richards, A. J. Clayton, L. E. Bird, R. J. Owens, D. C. J. Carpentier, F. L. King, J. O. Danquah, K. G. Spink and L. A. King (2010). "Improved expression of secreted and membrane-targeted proteins in insect cells." Biotechnology and Applied Biochemistry **56**: 85-93.

Ho, Y., H. R. Lo, T. C. Lee, C. P. Wu and Y. C. Chao (2004). "Enhancement of correct protein folding in vivo by a non-lytic baculovirus." Biochemical Journal **382**(2): 695-702.

Holtz, K. M., P. S. Robinson, E. E. Matthews, Y. Hashimoto, C. E. McPherson, N. Khramtsov, M. J. Reifler, J. Meghrou, D. G. Rhodes, M. M. Cox and I. K. Srivastava (2014). "Modifications of cysteine residues in the transmembrane and cytoplasmic domains of a recombinant hemagglutinin protein prevent cross-linked multimer formation and potency loss." BMC Biotechnology **14**: 111.

Holley, C. L., M. R. Olson, D. A. Colon-Ramos and S. Kornbluth (2002). "Reaper eliminates IAP proteins through stimulated IAP degradation and generalized translational inhibition." Nature Cell Biology **4**(6): 439-444.

Hom, L. G., T. Ohkawa, D. Trudeau and L. E. Volkman (2002). "*Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus ProV-CATH is activated during infected cell death." Virology **296**(2): 212-218.

Hopkins, R., D. Esposito and W. Gillette (2010). "Widening the bottleneck: increasing success in protein expression and purification." Journal of Structural Biology **172**(1): 14-20.

Hu, Y. C. (2005). "Baculovirus as a highly efficient expression vector in insect and mammalian cells." Acta Pharmacologica Sinica **26**(4): 405-416.

Huang, J. and D. B. Levin (1999). "Identification and functional analysis of a putative non-hr origin of DNA replication from the *Spodoptera littoralis* type B multinucleocapsid nucleopolyhedrovirus." Journal of General Virology **80** (8): 2263-2274.

Huang, N., S. Covicristov, C. J. Hawkins and R. J. Clem (2013). "SfDronc, an initiator caspase involved in apoptosis in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*." Insect Biochemistry and Molecular Biology **43**: 444-454.

Huang, N., W. Wu, K. Yang, A. L. Passarelli, G. F. Rohrmann and R. J. Clem (2011). "Baculovirus Infection Induces a DNA Damage Response that is Required for Efficient Viral Replication." Journal of Virology **85**(23): 12547.

Huang, Q., Q. L. Deveraux, S. Maeda, G. S. Salvesen, H. R. Stennicke, B. D. Hammock and J. C. Reed (2000). "Evolutionary conservation of apoptosis mechanisms: Lepidopteran and baculoviral inhibitor of apoptosis proteins are inhibitors of mammalian caspase-9." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(4): 1427-1432.

Huang, Q., Q. L. Deveraux, S. Maeda, H. R. Stennicke, B. D. Hammock and J. C. Reed (2001). "Cloning and characterization of an inhibitor of apoptosis protein (IAP) from *Bombyx mori*." Biochimica et Biophysica Acta **1499**(3): 191-198.

Huh, N. E. and R. F. Weaver (1990). "Identifying the RNA polymerases that synthesize specific transcripts of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus." Journal of General Virology **71** (Pt 1): 195-201.

Huijskens, I., L. Li, L. G. Willis and D. A. Theilmann (2004). "Role of AcMNPV IE0 in baculovirus very late gene activation." Virology **323**: 120-130.

Hulst, M. M., D. F. Westra, G. Wensvoort and R. J. Moormann (1993). "Glycoprotein E1 of Hog Cholera Virus Expressed in Insect Cells Protects Swine from Hog Cholera." Journal of Virology **67**(9): 5435-5442.

Hunt, I. (2005). "From gene to protein: a review of new and enabling technologies for multi-parallel protein expression." Protein Expression and Purification **40**: 1-22.

Ikeda, K. and M. Kobayashi (1999). "Cell-Cycle Perturbation in Sf9 Cells Infected with *Autographa californica* Nucleopolyhedrovirus." Virology **258**: 176–188.

Ikeda, M., H. Yamada, R. Hamajima and M. Kobayashi (2013). "Baculovirus genes modulating intracellular innate antiviral immunity of lepidopteran insect cells." Virology **435**: 1–13.

Ikeda, M., H. Yamada, H. Ito and M. Kobayashi (2011). "Baculovirus IAP1 induces caspase-dependent apoptosis in insect cells." Journal of General Virology **92**: 2654–2663.

Ikeda, M., K. Yanagimoto and M. Kobayashi (2004). "Identification and functional analysis of *Hyphantria cunea* nucleopolyhedrovirus *iap* genes." Virology **321**(2): 359-371.

Ikonomou, L., Y. J. Schneider and S. N. Agathos (2003). "Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins." Applied Microbiol Biotechnology **62**(1): 1-20.

Invitrogen (2010). Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System. California.

Ishikawa, H., M. Ikeda, K. Yanagimoto, C. A. Alves, Y. Katou, B. A. Laviña-Caoili and M. Kobayashi (2003). "Induction of apoptosis in an insect cell line, IPLB- Ld652Y, infected with nucleopolyhedroviruses." Journal of General Virology **84**: 705-714.

Ishimwe, E., J. J. Hodgson, R. J. Clem and A. L. Passarelli (2015). "Reaching the melting point: Degradative enzymes and protease inhibitors involved in baculovirus infection and dissemination." Virology **479-480**: 637-649.

Ishiyama, S. and M. Ikeda (2010). "High-level expression and improved folding of proteins by using the vp39 late promoter enhanced with homologous DNA regions." Biotechnol Lett **32**(11): 1637-1647.

Ito, E., D. Sahri, R. Knippers and E. B. Carstens (2004). "Baculovirus proteins IE-1, LEF-3, and P143 interact with DNA in vivo: a formaldehyde cross-linking study." Virology **329**(2): 337-347.

Jarvis, D. L. and M. D. Summers (1989). "Glycosylation and secretion of human tissue plasminogen activator in recombinant baculovirus-infected insect cells." Molecular and Cellular Biology **9**(1): 214-223.

Jarvis, D. L., M. D. Summers, J. A. García and D. A. Bohlmeier (1993). "Influence of Different Signal Peptides and Prosequences on Expression and Secretion of Human Tissue Plasminogen Activator in the Baculovirus System." The Journal of Biological Chemistry **268**(22): 16754-16762.

Jarvis, D. L., C. Weinkauff and L. A. Guarino (1996). "Immediate-Early Baculovirus Vectors for Foreign Gene Expression in Transformed or Infected Insect Cells." Protein Expression and Purification **8**(2): 191-203.

Jehle, J. A., G. W. Blissard, B. C. Bonning, J. S. Cory, E. A. Herniou, G. F. Rohrmann, D. A. Theilmann, S. M. Thiem and J. M. Vlak (2006). "On the classification and nomenclature of baculoviruses: A proposal for revision." Archives of Virology **151**(7): 1257-1266.

Ji, J. F. and X. H. Ma (2015). "Effect of baculovirus P35 protein on apoptosis in brain tissue of rats with acute cerebral infarction." Genetics Molecular Research **14**(3): 9353-9360.

Josefsberg, J. O. and B. Buckland (2012). "Vaccine process technology." Biotechnology and Bioengineering **109**(6): 1443-1460.

Kaba, S. A., A. M. Salcedo, P. O. Wafula, J. M. Vlak and M. M. van Oers (2004). "Development of a chitinase and v-cathepsin negative bacmid for improved integrity of secreted recombinant proteins." J Virol Methods **122**(1): 113-118.

Kato, T., M. Kajikawa, K. Maenaka and E. Y. Park. (2010). "Silkworm expression system as a platform technology in life science." Appl Microbiol Biotechnol **85**: 459-470.

Katsuma, S., K. Mita and T. Shimada (2007). "ERK- and JNK-Dependent Signaling Pathways Contribute to Bombyx mori Nucleopolyhedrovirus Infection." Journal of Virology **81**(24): 13700-13709.

Kelly, B. J., S. D. Chapple, C. Allen, C. Pritchard, L. A. King and R. D. Possee (2008). "Extended budded virus formation and induction of apoptosis by an AcMNPV FP-25/p35 double mutant in Trichoplusia ni cells." Virus Research **133**(2): 157-166.

Kelly, B. J., L. A. King and R. D. Possee (2007). Introduction to Baculovirus Molecular Biology. Baculovirus and Insect Cell Expression Protocols. D. W. Murhammer. Totawa, NJ, Humana Press. **388**: 25-54.

Kelly, B. J., L. A. King and R. D. Possee (2007). Introduction to Baculovirus Molecular Biology. Baculovirus and Insect Cell Expression Protocols. D. W. Murhammer. Totawa, NJ, Humana Press. **338**: 23-53.

Kelly, B. J., L. A. King, R. D. Possee and S. D. Chapple (2006). "Dual mutations in the *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus *FP-25* and *p35* genes result in plasma-membrane blebbing in *Trichoplusia ni* cells." Journal of General Virology **87**: 531–536.

Kim, E. J., S. F. Kramer, C. G. Hebert, J. J. Valdes and W. E. Bentley (2007). "Metabolic Engineering of the Baculovirus-expression System via Inverse “Shotgun” Genomic Analysis and RNA Interference (dsRNA) Increases Product Yield and Cell Longevity." Biotechnology and Bioengineering **98**: 645–654.

Kim, Y. S., H. Z. Xiao, E. Q. Du, G. S. Cai, S. Y. Lu and Y. P. Qi (2007). "Identification and Functional Analysis of LsMNPV Anti-Apoptosis Genes." J Biochem Mol Biol **40**(4): 571-576.

King, L. A. and R. D. Possee (1992). The baculoviruses. THE BACULOVIRUS EXPRESSION SYSTEM: A LABORATORY GUIDE. Londres, Chapman & Hall: 1-15.

Kitaguchi, K., R. Hamajima, H. Yamada, M. Kobayashi and M. Ikeda (2013). "Cloning and functional characterization of the *Lymantria dispar* initiator caspase *dronc*." Biochemical and Biophysical Research Communications **436**(2): 331-337.

Kollewe, C. and A. Vilcinskas (2013). "PRODUCTION OF RECOMBINANT PROTEINS IN INSECT CELLS." American Journal of Biochemistry and Biotechnology **9**(3): 255-271.

Kool, M., C. H. Ahrens, R. W. Goldbach, G. F. Rohrmann and J. M. Vlak (1994). "Identification of genes involved in DNA replication of the *Autographa californica* baculovirus." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(23): 11212-11216.

Kool, M., C. H. Ahrens, R. W. Goldbach, G. F. Rorhmann and J. M. Vlak (1994). "Identification of genes involved in DNA replication of the *Autographa californica* baculovirus." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**: 11212–11216.

Kool, M., C. H. Ahrens, J. M. Vlak and G. F. Rohrmann (1995). "Replication of baculovirus DNA." Journal of General Virology **76** (Pt 9): 2103-2118.

Kool, M., R. W. Goldbach and J. M. Vlak (1994). "A putative non-hr origin of DNA replication in the HindIII-K fragment of *Autographa californica* multiple nucleocapsid nuclear polyhedrosis virus." Journal of General Virology **75** (Pt 12): 3345-3352.

Kool, M., P. M. van den Berg, J. Tramper, R. W. Goldbach and J. M. Vlak (1993). "Location of two putative origins of DNA replication of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus." Virology **192**(1): 94-101.

Kool, M., J. T. Voeten, R. W. Goldbach, J. Tramper and J. M. Vlak (1993). "Identification of seven putative origins of *Autographa californica* multiple nucleocapsid nuclear polyhedrosis virus DNA replication." Journal of General Virology **74** (Pt 12): 2661-2668.

Kost, T. A., J. P. Condreay and D. L. Jarvis (2005). "Baculovirus as a versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells." Nature Biotechnology **23**(5): 567-575.

Kovacs, G. R., J. Choi, L. A. Guarino and M. D. Summers (1992). "Functional dissection of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus immediate-early 1 transcriptional regulatory protein." Journal of Virology **66**(12): 7429-7437.

Kovacs, G. R., L. A. Guarino and M. D. Summers (1991). "Novel regulatory properties of the IE1 and IE0 transactivators encoded by the baculovirus *Autographa californica* multicapsid nuclear polyhedrosis virus." Journal of Virology **65**(10): 5281-5288.

Krappa, R. and D. Knebel-Morsdorf (1991). "Identification of the very early transcribed baculovirus gene PE-38." Journal of Virology **65**(2): 805-812.

Kremer, A. and D. Knebel-Mörsdorf (1998). "The early baculovirus he65 promoter: On the mechanism of transcriptional activation by IE1." Virology **249**(2): 336-351.

Kroemer, J. A., B. C. Bonning and R. L. Harrison (2015). "Expression, delivery and function of insecticidal proteins expressed by recombinant baculoviruses." Viruses **7**(1): 422-455.

Kulakosky, P. C., P. R. Hughes and H. A. Wood (1998). "N-Linked glycosylation of a baculovirus-expressed recombinant glycoprotein in insect larvae and tissue culture cells." Glycobiology **8**(7): 741-745.

Kulakosky, P. C., M. L. Shuler and H. A. Wood (1998). "N-GLYCOSYLATION OF A BACULOVIRUS-EXPRESSED RECOMBINANT GLYCOPROTEIN IN THREE INSECT CELL LINES." In Vitro Cellular & Developmental Biology **34**(2): 101-108.

Kumarswamy, R., R. K. Seth, B. S. Dwarakanath and S. Chandna (2009). "Mitochondrial regulation of insect cell apoptosis: Evidence for permeability transition pore-independent cytochrome-c release in the Lepidopteran Sf9 cells." The International Journal of Biochemistry & Cell Biology **41**: 1430-1440.

Kuroda, K., A. Groner, K. Frese, D. Drenckhahn, C. Hauser, Rudolf Rott, W. Doerfler and H. D. Klenk (1989). "Synthesis of Biologically Active Influenza Virus Hemagglutinin in Insect Larvae." Journal of Virology **63**(4): 1677-1685.

Kuroda, K., C. Hauser, R. Rott, H. D. Klenk and W. Doerfler (1986). "Expression of the influenza virus haemagglutinin in insect cells by a baculovirus vector." The EMBO Journal **5**(6): 1359-1365.

LaCount, D. J. and P. D. Friesen (1997). "Role of early and late replication events in induction of apoptosis by baculoviruses." Journal of Virology **71**(2): 1530-1537.

LaCount, D. J., S. F. Hanson, C. L. Schneider and P. D. Friesen (2000). "Caspase inhibitor P35 and inhibitor of apoptosis Op-IAP block in vivo proteolytic activation of an effector caspase at different steps." J Biol Chem **275**(21): 15657-15664.

Lai, Y. K., J. T. Hsu, C. C. Chu, T. Y. Chang, K. L. Pan and C. C. Lin (2012). "Enhanced recombinant protein production and differential expression of molecular chaperones in *sf*-caspase-1-repressed stable cells after baculovirus infection." BMC Biotechnology **12**: 83.

Landais, I., R. Vincent, M. Bouton, G. Devauchelle, M. Duonor-Cerutti and M. Ogliastro (2006). "Functional analysis of evolutionary conserved clustering of bZIP binding sites in the baculovirus homologous regions (hrs) suggests a cooperativity between host and viral transcription factors." Virology **344**(2): 421-431.

Lanier, L. M. and L. E. Volkman (1998). "Actin Binding and Nucleation by *Autographa californica* M Nucleopolyhedrovirus." Virology **243**(1): 167-177.

Lannan, E., R. Vandergaast and P. D. Friesen (2007). "Baculovirus caspase inhibitors P49 and P35 block virus-induced apoptosis downstream of effector caspase DrICE activation in *Drosophila melanogaster* cells." Journal of Virology **81**(17): 9319-9330.

Le Gall-Recule, G., A. Lavazza, S. Marchandeu, S. Bertagnoli, F. Zwingelstein, P. Cavadini, N. Martinelli, G. Lombardi, J. L. Guerin, E. Lemaitre, A. Decors, S. Boucher, B. Le Normand and L. Capucci (2013). "Emergence of a new lagovirus related to Rabbit Haemorrhagic Disease Virus." Veterinary Research **44**: 81.

Lee, H. Y. and P. J. Krell (1992). "Generation and analysis of defective genomes of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus." Journal of Virology **66**(7): 4339-4347.

Lee, J. C., H. H. Chen and Y. C. Chao (1998). "Persistent Baculovirus Infection Results from Deletion of the Apoptotic Suppressor Gene *p35*." Journal of Virology **72**(11): 9157-9165.

Lee, K. S., M. R. Sohn, B. Y. Kim, Y. M. Choo, S. D. Woo, S. S. Yoo, Y. H. Je, J. Y. Choi, J. Y. Roh, H. N. Koo and B. R. Jin (2012). "Production of classical swine fever virus envelope glycoprotein E2 as recombinant polyhedra in baculovirus-infected silkworm larvae." Mol Biotechnol **50**(3): 211-220.

Leisy, D. J., C. Rasmussen, E. O. Owusu and G. F. Rohrmann (1997). "A Mechanism for Negative Gene Regulation in *Autographa californica* Multinucleocapsid Nuclear Polyhedrosis Virus." Journal of Virology **71**(7): 5088–5094.

Leisy, D. J. and G. F. Rohrmann (1993). "Characterization of the replication of plasmids containing hr sequences in baculovirus-infected *Spodoptera frugiperda* cells." Virology **196**(2): 722-730.

Li, E., S. L. Brown, C. S. Dolman, G. B. Brown and G. R. Nemerow (2001). "Production of functional antibodies generated in a nonlytic insect cell expression system." Protein Expr Purif **21**(1): 121-128.

Liao, W. T., Y. Yang and X. F. Wu (2002). "Expression and functional analysis of an inhibitor of apoptosis protein from *Trichoplusia ni*." Biochemical Biophysical Research Communications **293**(2): 675-679.

Lilley, C. E., R. A. Schwartz and M. D. Weitzman (2007). "Using or abusing: viruses and the cellular DNA damage response." Trends in Microbiology **15**(3): 119-126.

Lin, X., Y. Chen, Y. Yi and Z. Zhang (2010). "Baculovirus immediately early 1, a mediator for homologous regions enhancer function in *trans*." Virology Journal **7**: 32.

Liu, F., X. Wu, L. Li, S. Ge, Z. Liu and Z. Wang (2013). "Virus-like particles: Promising platforms with characteristics of DIVA for veterinary vaccine design." Comp Immunol Microbiol Infect Dis **36**(4): 343-352.

Liu, F., X. Wu, L. Li, Z. Liu and Z. Wang (2013). "Use of baculovirus expression system for generation of virus-like particles: successes and challenges." Protein Expr Purif **90**(2): 104-116.

Liu, F., X. Wu, L. Li, Z. Liu and Z. Wang (2013). "Use of baculovirus expression system for generation of virus-like particles: Successes and challenges." Protein Expression and Purification **90**(2): 104-116.

Liu, G., F. Zhang, J. Shi, G. Tian, H. Chen, K. Yu and Q. Meng (2013). "A subunit vaccine candidate derived from a classic H5N1 avian influenza virus in China protects fowls and BALB/c mice from lethal challenge." Vaccine **31**(46): 5398-5404.

- Liu, K.-Y., H. Yang, J.-X. Peng and H.-Z. Hong (2012). "Cytochrome c and insect cell apoptosis." Insect Science **19**(1): 30-40.
- Liu, K., D. Shu, N. Song, Z. Gai, Y. Yuan, J. Li, M. Li, S. Guo, J. Peng and H. Hong (2012). "The Role of Cytochrome c on Apoptosis Induced by *Anagrapha falcifera* Multiple Nuclear Polyhedrosis Virus in insect *Spodoptera litura* cells." Plos One **7**(8): e40877.
- Liu, L., J. Peng, K. Liu, H. Yang, Y. Li and H. Hong (2007). "Influence of cytochrome c on apoptosis induced by *Anagrapha (Syngrapha) falcifera* multiple nuclear polyhedrosis virus (AfMNPV) in insect *Spodoptera litura* cells." Cell Biology International **31**: 996-1001.
- Liu, Q. and N. Chejanovsky (2006). "Activation pathways and signal-mediated upregulation of the insect *Spodoptera frugiperda* caspase-1." Apoptosis **11**: 487-496.
- Liu, X., C. N. Kim, J. Yang, R. Jemmerson and X. Wang (1996). "Induction of Apoptotic Program in Cell-Free Extracts: Requirement for dATP and Cytochrome c." Cell **86**(1): 147-157.
- Liu, Y., N. DeCarolus and N. Beek (2007). Protein production with recombinant baculoviruses in lepidopteran larvae. Methods Mol Biol. New Jersey, Humana Press. **388**: 267-280.
- Long, G., X. Pan, R. Kormelink and J. M. Vlak (2006). "Functional entry of baculovirus into insect and mammalian cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis." Journal of Virology **80**(17): 8830-8833.
- Lopez-Vidal, J. (2014). Utilización de elementos reguladores en cis y trans para la mejora de vectores baculovirus. Doctorate, Universidad Complutense.
- López-Vidal, J., S. Gómez-Sebastián, J. Bárcena, M. d. C. Nuñez, D. Martínez-Alonso, B. Dudognon, E. Guijarro and J. M. Escribano (2015). "Improved Production Efficiency of Virus-Like Particles by the Baculovirus Expression Vector System." PLoS ONE **10**(10): e0140039.
- Lu, A., P. J. Krell, J. M. Vlak and G. F. Rohrmann (1997). Baculovirus DNA Replication. The Baculovirus. L. K. Miller. New York, Plenum Press: 171-192.
- Lu, A. and L. K. Miller (1995). "The roles of eighteen baculovirus late expression factor genes in transcription and DNA replication." Journal of Virology **69**(2): 975-982.
- Lu, L., Q. Du and N. Chejanovsky (2003). "Reduced expression of the immediate-early protein IE0 enables efficient replication of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus in poorly permissive *Spodoptera littoralis* cells." Journal of Virology **77**(1): 535-545.

Lu, L., H. Rivkin and N. Chejanovsky (2005). "The immediate-early protein IE0 of the *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus is not essential for viral replication." Journal of Virology **79**(15): 10077-10082.

Lu, M., R. R. Johnson and K. Iatrou (1996). "Trans-Activation of a Cell Housekeeping Gene Promoter by the IE1 Gene Product of Baculoviruses." Virology **218**(1): 103-113.

Luckow, V. A., S. C. Lee, G. F. Barry and P. O. Olins (1993). "Efficient Generation of Infectious Recombinant Baculoviruses by Site-Specific Transposon-Mediated Insertion of Foreign Genes into a Baculovirus Genome Propagated in *Escherichia coli*." Journal of Virology **67**(8): 4566-4579.

Luria, N., L. Lu and N. Chejanovsky (2012). "Conserved structural motifs at the C-terminus of baculovirus protein IE0 are important for its functions in transactivation and supporting hr5-mediated DNA replication." Viruses **4**(5): 761-776.

Mabashi-Asazuma, H., C. W. Kuo, K. H. Khoo and D. L. Jarvis (2014). "A novel baculovirus vector for the production of nonfucosylated recombinant glycoproteins in insect cells." Glycobiology **24**(3): 325-340.

Maeda, S. (1989). "EXPRESSION OF FOREIGN GENES IN INSECTS USING BACULOVIRUS VECTORS." The Annual Review of Entomology **34**: 351-372.

Maguire, T., P. Harrison, O. Hyink, J. Kalmakoff and V. K. Ward (2000). "The inhibitors of apoptosis of *Epiphyas postvittana* nucleopolyhedrovirus." J Gen Virol **81**(Pt 11): 2803-2811.

Manji, G. A. and P. D. Friesen (2001). "Apoptosis in Motion

An Apical, P35-Insensitive Caspase Mediates Programmed Cell Death in Insect Cells." The Journal of Biological Chemistry **276**(20): 16704-16710,.

Manji, G. A., R. R. Hozak, D. J. LaCount and P. D. Friesen (1997). "Baculovirus Inhibitor of Apoptosis Functions at or Upstream of the Apoptotic Suppressor P35 To Prevent Programmed Cell Death." Journal of Virology **71**(6): 4509-4516.

Margine, I., P. Palese and F. Krammer (2013). "Expression of functional recombinant hemagglutinin and neuraminidase proteins from the novel H7N9 influenza virus using the baculovirus expression system." Journal of Visualized Experiments(81): e51112.

Marin, M. S., J. M. Martin Alonso, L. I. Perez Ordoyo Garcia, J. A. Boga, J. L. Arguello-Villares, R. Casais, K. Venugopal, W. Jiang, E. A. Gould and F. Parra (1995). "Immunogenic properties of rabbit

haemorrhagic disease virus structural protein VP60 expressed by a recombinant baculovirus: an efficient vaccine." Virus Research **39**(2-3): 119-128.

Martin, D. W. and P. C. Weber (1997). "DNA replication promotes high-frequency homologous recombination during *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus infection." Virology **232**(2): 300-309.

Mathews, M. (1996). Interactions between viruses and the cellular machinery for protein synthesis. Translational control. J. Hershey, M. Mathews and N. Sonenberg. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 505–548.

Means, J. C., I. Muro and R. J. Clem (2006). "Lack of involvement of mitochondrial factors in caspase activation in a *Drosophila* cell-free system." Cell Death and Differentiation **13**(7): 1222-1234.

Mikhailov, V. S. and G. F. Rohrmann (2009). "Characterization of short-lived intermediates produced during replication of baculovirus DNA." Virus Research **145**(1): 106-111.

Milian, E. and A. A. Kamen (2015). "Current and emerging cell culture manufacturing technologies for influenza vaccines." BioMed Research International **2015**: 504831.

Miller, D. P., T. Luque, N. E. Crook, D. Winstanley and D. R. O'Reilly (2002). "Expression of the *Cydia pomonella* granulovirus *iap3* gene." Archives of Virology **147**: 1221–1236.

Mistretta, T. A. and L. A. Guarino (2005). "Transcriptional activity of baculovirus Very Late Factor 1." Journal of Virology **79**: 1958–1960.

Mitchell, J. K., N. M. Byers and P. D. Friesen (2013). "Baculovirus F-box protein LEF-7 modifies the host DNA damage response to enhance virus multiplication." Journal of Virology **87**(23): 12592-12599.

Mitchell, J. K. and P. D. Friesen (2012). "DNA Damage Response To Promote Virus Baculoviruses Modulate a Proapoptotic Multiplication." Journal of Virology **86**(24): 13542–13553.

Mohan, M., T. K. Taneja, S. Sahdev, K. Mohareer, R. Begum, M. Athar, N. K. Sah and S. E. Hasnain (2003). "Antioxidants prevent UV-induced apoptosis by inhibiting mitochondrial cytochrome c release and caspase activation in *Spodoptera frugiperda* (Sf9) cells." Cell Biology International **27**(6): 483-490.

Monsma, S. A., A. G. Oomens and G. W. Blissard (1996). "The GP64 Envelope Fusion Protein Is an Essential Baculovirus Protein Required for Cell-to-Cell Transmission of Infection." Journal of Virology **70**(7): 4607-4616.

Monteiro, F., N. Carinhas, M. J. Carrondo, V. Bernal and P. M. Alves (2012). "Toward system-level understanding of baculovirus-host cell interactions: from molecular fundamental studies to large-scale proteomics approaches." Frontiers in Microbiology **3**: 391.

Mueller, M., S. Renzullo, R. Brooks, N. Ruggli and M. A. Hofmann (2010). "Antigenic Characterization of Recombinant Hemagglutinin Proteins Derived from Different Avian Influenza Virus Subtypes." PLoS One **5**(2): e9097.

Munro, S. and H. R. Pelham (1987). "A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins." Cell **48**(5): 899-907.

Murhammer, D. W. (2007). Useful tips, widely used techniques and quantifying cell metabolic behaviour. Baculovirus and Insect Cell Expression Protocols D. W. Murhammer. Totawa, NJ, Humana Press. **338**: 2-22.

Muro, I., B. A. Hay and R. J. Clem (2002). "The Drosophila DIAP1 protein is required to prevent accumulation of a continuously generated, processed form of the apical caspase DRONC." J Biol Chem **277**(51): 49644-49650.

Muro, I., J. C. Means and R. J. Clem (2005). "Cleavage of the apoptosis inhibitor DIAP1 by the apical caspase DRONC in both normal and apoptotic *Drosophila* cells." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY **280**(19): 18683-18688.

Muro, I., K. Monser and R. J. Clem (2004). "Mechanism of Dronc activation in Drosophila cells." J Cell Sci **117**(Pt 21): 5035-5041.

Nagamine, T., T. Saito, H. Osada and S. Matsumoto (2015). "Dissection of two modes of IE1 sub-nuclear localization in baculovirus-infected cells." Virus Research **208**: 120-128.

Naggie, S. and W. E. Bentley (1998). "Appearance of Protease Activities Coincides with p10 and Polyhedrin-Driven Protein Production in the Baculovirus Expression System: Effects on Yield." Biotechnol. Prog. **14**: 227-232.

NCBI. "<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/GenomesGroup.cgi?taxid=10442>." Retrieved 22/10/2015.

Nguyen, Q., L. K. Nielsen and S. Reid (2013). "Genome Scale Transcriptomics of Baculovirus-Insect Interactions." Viruses **5**: 2721-2747.

Nie, Y., M. Fang and D. A. Theilmann (2009). "AcMNPV AC16 (DA26, BV/ODV-E26) regulates the levels of IE0 and IE1 and binds to both proteins via a domain located within the acidic transcriptional activation domain." Virology **385**(2): 484-495.

Nissen, M. S. and P. D. Friesen (1989). "Molecular analysis of the transcriptional regulatory region of an early baculovirus gene." Journal of Virology **63**(2): 493-503

Noad, R. and P. Roy (2003). "Virus-like particles as immunogens." Trends in Microbiology **11**(9): 438-444.

Nwe, N., Q. He, S. Damrongwatanapokin, Q. Du, I. Manopo, Y. Limlamthong, B. J. Fenner, L. Spencer and J. Kwang (2006). "Expression of hemagglutinin protein from the avian influenza virus H5N1 in a baculovirus/insect cell system significantly enhanced by suspension culture." BMC Microbiology **6**(16).

O'Reilly, D. R., L. K. Miller and V. A. Luckow (1994). Summary of baculovirus features relevant to expression vector. Baculovirus expression vectors a laboratory manual. New York, Oxford University Press: 27-32.

O'Reilly, D. R., L. K. Miller and V. A. Luckow (1994). Virus-Host Interactions. Baculovirus expression vectors a laboratory manual. New York, Oxford University Press: 24-26.

O'Reilly, D. R., L. K. Miller and V. A. Luckow (1994). Virus Methods. Baculovirus expression vectors a laboratory manual. New York, Oxford University Press: 27-32.

O'Reilly, D. R., L. K. Miller and V. A. Luckow (1994). Virus structure and the infection process. Baculovirus expression vectors a laboratory manual. Nueva York, Oxford University Press, Inc.: 3-11.

O'Riordan, M. X., L. D. Bauler, F. L. Scott and C. S. Duckett (2008). "Inhibitor of apoptosis proteins in eukaryotic evolution and development: a model of thematic conservation." Development Cell **15**(4): 497-508.

Ohkawa, T., L. E. Volkman and M. D. Welch (2010). "Actin-based motility drives baculovirus transit to the nucleus and cell surface." Journal of Cell Biology **190**(2): 187-195.

Ohlinger, V. F., B. Haas, G. Meyers, F. Weiland and H. J. Thiel (1990). "Identification and characterization of the virus causing rabbit hemorrhagic disease." J Virol **64**(7): 3331-3336.

Ohresser, M., N. Morin, M. Cerutti and C. Delsert (1994). "Temporal Regulation of a Complex and Unconventional Promoter by Viral Products." Journal of Virology **68**(4): 2589-2597

Okamoto, T., T. Minamikawa, G. Edward, V. Vakharia and E. Herman (1999). "Posttranslational removal of the carboxyl-terminal KDEL of the cysteine protease SH-EP occurs prior to maturation of the enzyme." The Journal of Biological Chemistry **274**(16): 11390-11398.

Okano, K., V. S. Mikhailov and S. Maeda (1999). "Colocalization of Baculovirus IE-1 and Two DNA-Binding Proteins, DBP and LEF-3, to Viral Replication Factories." Journal of Virology **3**(1): 110–119.

Okano, K., A. L. Vanarsdall, V. S. Mikhailov and G. F. Rohrmann (2006). "Conserved molecular systems of the Baculoviridae." Virology **344**(1): 77-87.

Okano, K., A. L. Vanarsdall and G. F. Rohrmann (2007). "A baculovirus alkaline nuclease knockout construct produces fragmented DNA and aberrant capsids." Virology **359**(1): 46-54.

Olson, V. A., J. A. Wetter and P. D. Friesen (2001). "Oligomerization mediated by a helix-loop-helix-like domain of baculovirus IE1 is required for early promoter transactivation." Journal of Virology **75**(13): 6042-6051.

Olson, V. A., J. A. Wetter and P. D. Friesen (2002). "Baculovirus Transregulator IE1 Requires a Dimeric Nuclear Localization Element for Nuclear Import and Promoter Activation." Journal of Virology **76**(18): 9505–9515.

Olson, V. A., J. A. Wetter and P. D. Friesen (2003). "The highly conserved basic domain I of baculovirus IE1 is required for hr enhancer DNA binding and hr-dependent transactivation." Journal of Virology **77**(10): 5668-5677.

OMS. "<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>." Retrieved 05/03/2016.

Ono, C., M. Sato, H. Taka, S. Asano, Y. Matsuura and H. Bando (2015). "Tightly regulated expression of *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus immediate early genes emerges from their interactions and possible collective behaviors." PLoS One **10**(3): e0119580.

Ooi, B. G. and L. K. Miller (1988). "Regulation of host RNA levels during baculovirus infection." Virology **166**(2): 515-523.

Oomens, A. G. and G. W. Blissard (1999). "Requirement for GP64 to Drive Efficient Budding of *Autographa californica* Multicapsid Nucleopolyhedrovirus." Virology **254**(2): 297-314.

Oppenheimer, D. I. and L. E. Volkman (1997). "Evidence for rolling circle replication of *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus genomic DNA." Archives of Virology **142**(10): 2107-2113.

Palmberger, D., I. B. Wilson, I. Berger, R. Grabherr and D. Rendic (2012). "SweetBac: A New Approach for the Production of Mammalianised Glycoproteins in Insect Cells." PLoS One **7**(4): e34226.

Palomares, L. A., S. Estrada-Mondaca and O. T. Ramirez (2004). "Production of recombinant proteins: challenges and solutions." Methods Mol Biol **267**: 15-52.

Palomares, L. A., M. Realpe and O. T. Ramírez (2015). An Overview of Cell Culture Engineering for the Insect Cell-Baculovirus Expression Vector System (BEVS). Animal Cell Culture. M. Al-Rubeai. Cham, Springer International Publishing: 501-519.

Parra, F. and M. Prieto (1990). "Purification and characterization of a calicivirus as the causative agent of a lethal hemorrhagic disease in rabbits." J Virol **64**(8): 4013-4015.

Passarelli, A. L. and L. K. Miller (1993). "Three baculovirus genes involved in late and very late gene expression: ie-1, ie-n, and lef-2." Journal of Virology **67**(4): 2149-2158.

Pathakamuri, J. A. and D. A. Theilmann (2002). "The acidic activation domain of the baculovirus transactivator IE1 contains a virus-specific domain essential for DNA replication." Journal of Virology **76**(11): 5598-5604.

Pearson, M. N., C. Groten and G. F. Rohrmann (2000). "Identification Of The *Lymantria dispar* Nucleopolyhedrovirus Envelope Fusion Protein Provides Evidence For A Phylogenetic Division Of The Baculoviridae." J Virol **74**(13): 6126-6131.

Pearson, M. N. and G. F. Rohrmann (1997). "Splicing is required for transactivation by the immediate early gene 1 of the *Lymantria dispar* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus." Virology **235**(1): 153-165.

Pearson, M. N. and G. F. Rohrmann (2002). "Transfer, incorporation, and substitution of envelope fusion proteins among members of the Baculoviridae, Orthomyxoviridae, and Metaviridae (insect retrovirus) families." *J Virol* **76**(11): 5301-5304.

Pecora, A., D. A. Malacari, A. S. Pérez-Aguirreburualde, D. Bellido, J. M. Escribano, M. J. Dos Santos and A. Wigdorovitz (2015). "Development of an enhanced bovine viral diarrhea virus subunit vaccine based on E2 glycoprotein fused to a single chain antibody which targets to antigen-presenting cells." *Rev. Argent. Microbiol.* **47**: 4-8.

Pennock, G. D., C. Shoemaker and L. K. Miller (1984). "Strong and regulated expression of Escherichia coli beta-galactosidase in insect cells with a baculovirus vector." *Mol Cell Biol* **4**(3): 399-406.

Pérez-Filgueira, D. M., P. Resino-Talaván, C. Cubillos, I. Angulo, M. G. Barderas, J. Barcena and J. M. Escribano (2007). "Development of a low-cost, insect larvae-derived recombinant subunit vaccine against RHDV." *Virology* **364**(2): 422-430.

Petrucelli, S., M. S. Otegui, F. Lareu, O. Tran Dinh, A. C. Fitchette, A. Circosta, M. Rumbo, M. Bardor, R. Carcamo, V. Gomord and R. N. Beachy (2006). "A KDEL-tagged monoclonal antibody is efficiently retained in the endoplasmic reticulum in leaves, but is both partially secreted and sorted to protein storage vacuoles in seeds." *Plant Biotechnology Journal* **4**(5): 511-527.

Pham, M. Q., S. Naggie, M. Wier, H. J. Cha and W. E. Bentley (1999). "Human interleukin-2 production in insect (*Trichoplusia ni*) larvae: effects and partial control of proteolysis." *Biotechnol Bioeng* **62**(2): 175-182.

Possee, R. D. (1986). "Cell-surface expression of influenza virus haemagglutinin in insect cells using a baculovirus vector." *Virus Research* **5**(1): 43-59.

Possee, R. D. and L. A. King (1992). Propagation of the baculoviruses in insect larvae. *The baculovirus expression system a lab guide*. London, Chapman & Hall: 180-194.

Possee, R. D., C. J. Thomas and L. A. King (1999). "The use of baculovirus vectors for the production of membrane proteins in insect cells." *Biochem Society Transactions* **27**(6): 928-932.

Price, P. M., C. F. Reichelderfer, B. E. Johansson, E. D. Kildbourne and G. Acs. (1989). "Proteins of hepatitis B virus and influenza virus (baculovirus/hepatitis B surface antigen/influenza A virus neuraminidase) Complementation of recombinant baculoviruses by coinfection with wild-type virus facilitates production in insect larvae." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 1453-1414-1456.

Prikhod'ko, E. A. and L. K. Miller (1996). "Induction of apoptosis by baculovirus transactivator IE1." J Virol **70**(10): 7116-7124.

Prikhod'ko, E. A. and L. K. Miller (1998). "Role of Baculovirus IE2 and Its RING Finger in Cell Cycle Arrest." Journal of Virology **72**(1): 684-692.

Prikhod'ko, E. A. and L. K. Miller (1999). "The baculovirus PE38 protein augments apoptosis induced by transactivator IE1." Journal of Virology **73**(8): 6691-6699.

Pullen, S. S. and P. D. Friesen (1995). "Early transcription of the ie-1 transregulator gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus is regulated by DNA sequences within its 5' noncoding leader region." Journal of Virology **69**(1): 156-165.

Pumpens, P. and E. Grens (2001). "HBV core particles as a carrier for B cell/T cell epitopes." Intervirology **44**(2-3): 98-114.

Pyle, L. E., P. Barton, Y. Fujiwara, A. Mitchell and N. Fidge (1995). "Secretion of biologically active human proapolipoprotein A-I in a baculovirus-insect cell system: protection from degradation by protease inhibitors." Journal of Lipid Research **36**(11): 2355-2361.

Qin, J. C., A. F. Liu and R. F. Weaver (1989). "Studies on the control region of the p10 gene of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus." Journal of General Virology **70** (Pt 5): 1273-1279.

Rabizadeh, S., D. J. LaCount, P. D. Friesen and D. E. Bredesen (1993). "Expression of the Baculovirus *p35* Gene Inhibits Mammalian Neural Cell Death." Journal of Neurochemistry **61**: 2318-2321.

Rapp, J. C., J. A. Wilson and L. K. Miller (1998). "Nineteen baculovirus open reading frames, including LEF-12, support late gene expression." Journal of Virology **72**(12): 10197-10206.

Regev, A., H. Rivkin, M. Gurevitz and N. Chejanovsky (2006). "New measures of insecticidal efficacy and safety obtained with the *39K* promoter of a recombinant baculovirus." FEBS Letters **580**(30): 6777-6782.

Rhee, W. J., E. J. Kim and T. H. Park (1999). "Kinetic Effect of Silkworm Hemolymph on the Delayed Host Cell Death in an Insect Cell-Baculovirus System." Biotechnology Progress **15**: 1028-1032.

Rhee, W. J. and T. H. Park (2000). "Silkworm Hemolymph Inhibits Baculovirus-Induced Insect Cell Apoptosis." Biochemical and Biophysical Research Communications **271**: 186-190.

Ribeiro, B. M., K. Hutchinson and L. K. Miller (1994). "A mutant baculovirus with a temperature-sensitive IE-1 transregulatory protein." Journal of Virology **68**(2): 1075-1084.

Rodems, S. M. and P. D. Friesen (1993). "The hr5 transcriptional enhancer stimulates early expression from the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome but is not required for virus replication." J Virol **67**(10): 5776-5785.

Rodems, S. M. and P. D. Friesen (1995). "Transcriptional enhancer activity of hr5 requires dual-palindrome half sites that mediate binding of a dimeric form of the baculovirus transregulator IE1." Journal of Virology **69**(9): 5368-5375.

Rodems, S. M., S. S. Pullen and P. D. Friesen (1997). "DNA-dependent transregulation by IE1 of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: IE1 domains required for transactivation and DNA binding." Journal of Virology **71**(12): 9270-9277.

Rohrmann, G. F. (2013). Baculovirus expression technology: Theory and application. Baculovirus Molecular Biology: Third Edition. Bethesda, National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information

Department of Microbiology

Oregon State University

Corvallis, OR 97331-3804

129-140.

Rohrmann, G. F. (2013). Baculovirus late transcription. Baculovirus Molecular Biology: Third Edition. Bethesda, National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information
95-106.

Rohrmann, G. F. (2013). The baculovirus replication cycle: Effects on cells and insects. Baculovirus Molecular Biology: Third Edition. Bethesda, National Center for Biotechnology Information: 47-64.

Rohrmann, G. F. (2013). Baculoviruses as insecticides; three examples. Baculovirus Molecular Biology: Third Edition. Bethesda, National Center for Biotechnology Information (US): 125-128.

Rohrmann, G. F. (2013). DNA replication and genome processing. Baculovirus Molecular Biology: Third Edition. Bethesda, National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information

75-94.

Rohrmann, G. F. (2013). Early events in infection: Virus transcription. Baculovirus Molecular Biology: Third Edition. Bethesda, National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information

65-74.

Rohrmann, G. F. (2013). Introduction to the baculoviruses, their taxonomy, and evolution. Baculovirus Molecular Biology: Third Edition. Bethesda, National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information

9-22.

Rohrmann, G. F. (2013). Structural proteins of baculovirus occlusion bodies and virions. Baculovirus Molecular Biology: Third Edition Bethesda, National Center for Biotechnology Information (US): 23-46.

Roldao, A., M. C. Mellado, L. R. Castilho, M. J. Carrondo and P. M. Alves (2010). "Virus-like particles in vaccine development." Expert Rev Vaccines **9**(10): 1149-1176.

Roy, P. and R. Noad (2012). "Use of Bacterial Artificial Chromosomes in Baculovirus Research and Recombinant Protein Expression: Current Trends and Future Perspectives." ISRN Microbiology.

Sah, N. K., T. K. Taneja, N. Pathak, R. Begum, M. Athar and S. E. Hasnain (1999). "The baculovirus antiapoptotic p35 gene also functions via an oxidant-dependent pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(9): 4838-4843.

Sahdev, S., T. K. Taneja, M. Mohan, N. K. Sah, A. K. Khar, S. E. Hasnain and M. Athar (2003). "Baculoviral p35 inhibits oxidant-induced activation of mitochondrial apoptotic pathway." Biochem Biophys Res Commun **307**(3): 483-490.

Salem, T. Z., F. Zhang, Y. Xie and S. M. Thiem (2011). "Comprehensive analysis of host gene expression in *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus-infected *Spodoptera frugiperda* cells." Virology **412**(1): 167-178.

Sampieri, A., A. Luz-Madrigal, J. Zepeda and L. Vaca (2015). "Identification of fragments from *Autographa Californica* polyhedrin protein essential for self-aggregation and exogenous protein incorporation." BMC Biochem **16**(1): 5.

Sano, K., K. Maeda, M. Oki and Y. Maeda (2002). "Enhancement of protein expression in insect cells by a lobster tropomyosin cDNA leader sequence." FEBS Letters **532**(1-2): 143-146.

Santiago, F. W., K. Lambert Emo, T. Fitzgerald, J. J. Treanor and D. J. Topham (2012). "Antigenic and immunogenic properties of recombinant hemagglutinin proteins from H1N1 A/Brisbane/59/07 and B/Florida/04/06 when produced in various protein expression systems." Vaccine **30**(31): 4606-4616.

Schneider, R. J. and I. Mohr (2003). "Translation initiation and viral tricks." Trends Biochem Sci **28**(3): 130-136.

Schultz, K. L., J. A. Wetter, D. C. Fiore and P. D. Friesen (2009). "Transactivator IE1 is required for baculovirus early replication events that trigger apoptosis in permissive and nonpermissive cells." Journal of Virology **83**(1): 262-272.

Schultz, K. L. W. and P. D. Friesen (2009). "Baculovirus DNA Replication-Specific Expression Factors Trigger Apoptosis and Shutoff of Host Protein Synthesis during Infection." Journal of Virology **83**(1): 11123.

Seshagiri, S. and L. K. Miller (1997). "Baculovirus inhibitors of apoptosis (IAPs) block activation of Sf-caspase-1." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**: 13606–13611.

Seshagiri, S., D. Vucic, J. Lee and V. M. Dixit (1999). "Baculovirus-based genetic screen for antiapoptotic genes identifies a novel IAP." The Journal of Biological Chemistry **274**(51): 36769-36773.

Settles, E. W. and P. D. Friesen (2008). "Flock House Virus Induces Apoptosis by Depletion of *Drosophila* Inhibitor-of-Apoptosis Protein DIAP1." Journal of Virology **82**(3): 1378-1388.

Seviour, E. G. and S. Y. Lin (2010). "The DNA damage response: Balancing the scale between cancer and ageing." Aging **2**(12): 900-907.

Shan, S., K. Liu, J. Peng, H. Yao, Y. Li and H. Hong (2009). "Mitochondria are involved in apoptosis induced by ultraviolet radiation in lepidopteran *Spodoptera litura* cell line." Insect Science **16**(6): 485-491.

Shi, X. and D. L. Jarvis (2007). "Protein N-glycosylation in the baculovirus-insect cell system." Current Drug Targets **8**(10): 1116-1125.

Sisk, W. P., J. D. Bradley, R. J. Leipold, A. M. Stoltzfus, M. Ponce de Leon, M. Hilf, C. Peng, G. H. Cohen and R. J. Eisenberg (1994). "High-level expression and purification of secreted forms of herpes simplex virus type 1 glycoprotein gD synthesized by baculovirus-infected insect cells." Journal of Virology **68**(2): 766-775.

Skowronski, D. M., N. Z. Janjua, G. De Serres, S. Sabaiduc, A. Eshaghi, J. A. Dickinson, K. Fonseca, A. L. Winter, J. B. Gubbay, M. Kraiden, M. Petric, H. Charest, N. Bastien, T. L. Kwindt, S. M. Mahmud, P. Van Caesele and Y. Li (2014). "Low 2012-13 influenza vaccine effectiveness associated with mutation in the egg-adapted H3N2 vaccine strain not antigenic drift in circulating viruses." PLoS One **9**(3): e92153.

Slack, J. and B. M. Arif (2007). "The baculoviruses occlusion-derived virus: virion structure and function." Advances in Virus Research **69**: 99-165.

Slack, J. M. and G. W. Blissard (1997). "Identification of two independent transcriptional activation domains in the *Autographa californica* multicapsid nuclear polyhedrosis virus IE1 protein." Journal of Virology **71**(12): 9579-9587.

Smith, G. E., M. D. Summers and M. J. Fraser (1983). "Production of Human Beta Interferon in Insect Cells Infected with a Baculovirus Expression Vector." Molecular and Cellular Biology: 2156-2165.

Sokal, N., Y. Nie, L. G. Willis, J. Yamagishi, G. W. Blissard, M. R. Rheault and D. A. Theilmann (2014). "Defining the roles of the baculovirus regulatory proteins IE0 and IE1 in genome replication and early gene transactivation." Virology **468-470**: 160-171.

Song, G., G. Ouyang and S. Bao (2005). "The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival." Journal of Cellular and Molecular Medicine **9**(1): 59-71.

Srinivasula, S. M. and J. D. Ashwell (2008). "IAPs: what's in a name?" Molecular Cell **30**(2): 123-135.

Sriwilaijaroen, N. and Y. Suzuki (2012). "Molecular basis of the structure and function of H1 hemagglutinin of influenza virus." The Proceedings of the Japan Academy, Series B, Physical and Biological Science **88**(6): 226-249.

Stepanyuk, G. A., H. Xu, C. K. Wu, S. V. Markova, J. Lee, E. S. Vysotski and B. C. Wang (2008). "Expression, purification and characterization of the secreted luciferase of the copepod *Metridia longa* from Sf9 insect cells." Protein Expression and Purification **61**(2): 142-148.

Stewart, T. M., I. Huijskens, L. G. Willis and D. A. Theilmann (2005). "The *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus ie0-ie1 gene complex is essential for wild-type virus replication, but either IE0 or IE1 can support virus growth." Journal of Virology **79**(8): 4619-4629.

Suganuma, I., T. Ushiyama, H. Yamada, A. Iwamoto, M. Kobayashi and M. Ikeda (2011). "Cloning and characterization of a *dronc* homologue in the silkworm, *Bombyx mori*." Insect Biochemistry and Molecular Biology **41**: 909-921.

Sugimoto, A., P. D. Friesen and J. H. Rothman (1994). "Baculovirus *p35* prevents developmentally programmed cell death and rescues a *ced-9* mutant in the nematode *Caenorhabditis elegans*." The EMBO Journal **13**(9): 2023-2028.

Sugiura, T., S. Sugita, H. Imagawa, T. Kanaya, S. Ishiyama, N. Saeki, A. Uchiyama, M. Tanigawa and A. Kuwano (2001). "Serological diagnosis of equine influenza using the hemagglutinin protein produced in a baculovirus expression system." Journal of Virological Methods **98**(1): 1-8.

Summers, M. D. (2006). "Milestones leading to the genetic engineering of baculoviruses as expression vector systems and viral pesticides." Advances in Virus Research **68**: 3-73.

Taggart, D. J., J. K. Mitchell and P. D. Friesen (2012). "A conserved N-terminal domain mediates required DNA replication activities and phosphorylation of the transcriptional activator IE1 of Autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus." Journal of Virology **86**(12): 6575-6585.

Tate, C. G., E. Whiteley and M. J. Betenbaugh (1999). "Molecular chaperones improve functional expression of the serotonin (5-hydroxytryptamine) transporter in insect cells." Biochem Society Transactions **27**(6): 932-936.

Teng, C. Y., S. L. Chang, M. M. van Oers and T. Y. Wu (2013). "Enhanced Protein Secretion From Insect Cells by Co-Expression of the Chaperone Calreticulin and Translation Initiation Factor eIF4E." Molecular Biotechnology **54**(1): 68-78.

Terron-Exposito, R., B. Dudognon, I. Galindo, J. I. Quetglas, J. M. Coll, J. M. Escibano and E. Gomez-Casado (2012). "Antibodies against *Marinobacter algicola* and *Salmonella typhimurium* Flagellins Do Not Cross-Neutralize Tlr5 Activation." PLoS One **7**(11): e48466.

Tessier, D. C., D. Y. Thomas, H. E. Khouri, F. Laliberte and T. Vernet (1991). "Enhanced secretion from insect cells of a foreign protein fused to the honeybee melittin signal peptide." Gene **98**(2): 177-183.

Theilmann, D. A. and G. W. Blissard (2008). Baculoviruses: Molecular Biology of Nucleopolyhedroviruses. San Diego, ELSEVIER: 434-445.

Theilmann, D. A. and S. Stewart (1992). "Tandemly repeated sequence at the 3' end of the IE-2 gene of the baculovirus *Orgyia pseudotsugata* multicapsid nuclear polyhedrosis virus is an enhancer element." Virology **187**(1): 97-106.

Theilmann, D. A. and S. Stewart (1993). "Analysis of the *Orgyia pseudotsugata* multicapsid nuclear polyhedrosis virus trans-activators IE-1 and IE-2 using monoclonal antibodies." Journal of General Virology **74** (Pt 9): 1819-1826.

Theilmann, D. A., L. G. Willis, B. J. Bosch, I. J. Forsythe and Q. Li (2001). "The baculovirus transcriptional transactivator ie0 produces multiple products by internal initiation of translation." Virology **290**(2): 211-223.

Thiem, S. M. (2009). "Baculovirus genes affecting host function." In Vitro Cell Dev Biol Anim **45**(3-4): 111-126.

Thiem, S. M. and L. K. Miller (1989). "Identification, sequence, and transcriptional mapping of the major capsid protein gene of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus." Journal of Virology **63**(5): 2008-2018.

Todd, J. W., A. L. Passarelli and L. K. Miller (1995). "Eighteen Baculovirus Genes, Including *lef-11*, *p35*, *39K*, and *p47*, Support Late Gene Expression." Journal of Virology **69**(2): 968-974.

Todd, J. W., A. L. Passarelli and L. K. Miller (1996). "Factors regulating baculovirus late and very late gene expression in transient expression assays." Journal of Virology **70**(4): 2307-2317.

Treanor, J. J., H. E. Sahly, J. King, I. Graham, R. Izikson, R. Kohberger, P. Patriarca and M. Cox (2011). "Protective efficacy of a trivalent recombinant hemagglutinin protein vaccine (FluBlok®) against influenza in healthy adults: A randomized, placebo-controlled trial." Vaccine **29**(44): 7733-7739.

Treanor, J. J., G. M. Schiff, R. B. Couch, T. R. Cate, R. C. Brady, C. M. Hay, M. Wolff, D. She and M. M. Cox (2006). "Dose-related safety and immunogenicity of a trivalent baculovirus-expressed influenza-virus hemagglutinin vaccine in elderly adults." The Journal of Infectious Diseases **193**(9): 1223-1228.

Treanor, J. J., G. M. Schiff, F. G. Hayden, R. C. Brady, C. M. Hay, A. L. Meyer, J. Holden-Wiltse, H. Liang, A. Gilbert and M. Cox (2007). "Safety and immunogenicity of a baculovirus-expressed hemagglutinin influenza vaccine: a randomized controlled trial." JAMA **297**(14): 1577-1582.

Tremblay, N. M., B. P. Kennedy, I. P. Street, W. J. Kaupp, F. Laliberte and P. K. Weech (1993). "Human group II phospholipase A2 expressed in *Trichoplusia ni* larvae--isolation and kinetic properties of the enzyme." Protein Expr Purif **4**(5): 490-498.

Usami, K., S. Ishiyama, C. Enomoto, H. Okazaki, K. Higuchi, M. Ikeda, T. Yamamoto, M. Sugai, Y. Ishikawa, Y. Hosaka, T. Koyama, Y. Tobita, S. Ebihara, T. Mochizuki, Y. Asano and H. Nagaya (2010). "Comparison of recombinant protein expression in a baculovirus system in insect cells (Sf9) and silkworm." J. Biochem. **149**: 219-227.

van Oers, M. M. (2006). "Vaccines for viral and parasitic diseases produced with baculovirus vectors." Adv Virus Res **68**: 193-253.

van Oers, M. M. (2011). "Opportunities and challenges for the baculovirus expression system." Journal of Invertebrate Pathobiology **107**: S3-S15.

van Oers, M. M., J. T. Flipsen, C. B. Reusken, E. L. Sliwinsky, R. W. Goldbach and J. M. Vlak (1993). "Functional domains of the p10 protein of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus." Journal of General Virology **74** (4): 563-574.

van Oers, M. M., G. P. Pijlman and J. M. Vlak. (2015). "Thirty years of baculovirus-insect cell protein expression: From dark horse to mainstream technology." Journal of General Virology **96**: 6-23.

van Oers, M. M., A. A. Thomas, R. J. Moormann and J. M. Vlak (2001). "Secretory pathway limits the enhanced expression of classical swine fever virus E2 glycoprotein in insect cells." Journal of Biotechnology **86**: 31-38.

van Oers, M. M., L. T. J. N. van der Veken, J. M. Vlak and A. A. M. Thomas (2001). "Effect of baculovirus infection on mRNA and protein levels of the *Spodoptera frugiperda* eukaryotic initiation factor 4E." Insect Molecular Biology **10**(3): 255-264.

van Oers, M. M. and J. M. Vlak (2007). "Baculovirus genomics." Curr Drug Targets **8**(10): 1051-1068.

Vandergaast, R., J. K. Mitchell, N. M. Byers and P. D. Friesen (2015). "Insect Inhibitor of Apoptosis IAPs are Negatively Regulated by Signal-Induced N-Terminal Degrons Absent within Viral IAPs." Journal of Virology **89**(8): 4481-4493.

Vandergaast, R., K. L. Schultz, R. J. Cerio and P. D. Friesen (2011). "Active Depletion of Host Cell Inhibitor-of-Apoptosis Proteins Triggers Apoptosis upon Baculovirus DNA Replication." Journal of Virology **85**(16): 8348-8358.

Venkaiah, B., P. Viswanathan, S. Habib and S. E. Hasnain (2004). "An Additional Copy of the Homologous Region (hr1) Sequence in the *Autographa californica* Multinucleocapsid Polyhedrosis Virus Genome Promotes Hyperexpression of Foreign Genes." Biochemistry **43**(25): 8143-8151.

Vernet, T., D. C. Tessier, C. Richardson, F. Laliberte, H. E. Khouri, A. W. Bell, A. C. Storer and D. Y. Thomas (1990). "Secretion of functional papain precursor from insect cells. Requirement for N-glycosylation of the pro-region." The Journal of Biological Chemistry **265**(27): 16661-16666.

Vicente, T., A. Roldao, C. Peixoto, M. J. Carrondo and P. M. Alves (2011). "Large-scale production and purification of VLP-based vaccines." Journal of Invertebrate Pathology **107** Suppl: S42-48.

Vieira, H. L., A. C. Pereira, M. J. Carrondo and P. M. Alves (2006). "Catalase effect on cell death for the improvement of recombinant protein production in baculovirus-insect cell system." Bioprocess and Biosystems Engineering **29**(5-6): 409-414.

Vieira, H. L. A., A. C. P. Pereira, C. C. Peixoto, R. H. P. Moraes, P. M. Alves and R. Z. Mendonça (2010). "Improvement of recombinant protein production by an anti-apoptotic protein from hemolymph of *Lonomia obliqua*." Cytotechnology **62**: 547-555.

Viswanathan, P., B. Venkaiah, M. S. Kumar, S. Rasheedi, S. Vrati, M. D. Bashyam and S. E. Hasnain (2003). "The homologous region sequence (hr1) of *Autographa californica* multinucleocapsid polyhedrosis virus can enhance transcription from non-baculoviral promoters in mammalian cells." The Journal of Biological Chemistry **278**(52): 52564-52571.

Vlak, J. M., A. F. Klinkenberg, K. J. M. Zaal, M. Usmany, E. C. Klinge-Roode, J. B. F. Geervliet, J. Roosien and J. W. M. Van Lent (1988). "Functional Studies on the p10 Gene of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus Using a Recombinant Expressing a p10- β -Galactosidase Fusion Gene." Journal of General Virology **69**(4): 765-776.

Vlak, J. M., A. Schouten, M. Usmany, G. J. Belsham, E. C. Klinge-Roode, A. J. Maule, J. W. Van Lent and D. Zuidema (1990). "Expression of Cauliflower Mosaic Virus Gene I Using a Baculovirus Vector Based Upon the p10 Gene and a Novel Selection Method." Virology **179**(1): 312-320.

Vlak, J. M., G. E. Smith and M. D. Summers (1981). "Hybridization Selection and In Vitro Translation of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus mRNA." Journal of Virology **40**(3): 762-771.

Volgestein, B. and D. Gillespie (1979). "Preparative and analytical purification of DNA from agarose." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**: 615-619.

Vucic, D., S. Seshagiri and L. K. Miller (1997). "Characterization of Reaper- and FADD-Induced Apoptosis in a Lepidopteran Cell Line." Molecular and Cellular Biology **17**(2): 667-676.

Walker, J. (2010). Protein structure, purification, characterisation and function analysis. Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology. K. Wilson and J. Walker. Cambridge, Cambridge University Press: 300-350.

Wang, H. and R. J. Clem (2011). "The role of IAP antagonist proteins in the core apoptosis pathway of the mosquito disease vector *Aedes aegypti*." Apoptosis **16**: 235–248.

Wang, J. W. and R. B. Roden (2013). "Virus-like particles for the prevention of human papillomavirus-associated malignancies." Expert Rev Vaccines **12**(2): 129-141.

Wang, K., K. M. Holtz, K. Anderson, R. Chubet, W. Mahmoud and M. M. J. Cox (2006). "Expression and purification of an influenza hemagglutinin—one step closer to a recombinant protein-based influenza vaccine." Vaccine **24**: 2176–2185.

Wang, R., F. Deng, D. Hou, Y. Zhao, L. Guo, H. Wang and Z. Hu (2010). "Proteomics of the *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus budded virions." Journal of Virology **84**(14): 7233-7242.

Wei, C. J., J. C. Boyington, K. Dai, K. V. Houser, M. B. Pearce, W. P. Kong, Z. Y. Yang, T. M. Tumpey and G. J. Nabel (2010). "Cross-Neutralization of 1918 and 2009 Influenza Viruses: Role Of Glycans in Viral Evolution and Vaccine Design." Science Translational Medicine **2**(24): 24ra21.

Weitzman, M. D., C. E. Lilley and M. S. Chaurushiya (2010). "Genomes in conflict: maintaining genome integrity during virus infection." Annual Review of Microbiology **64**: 61-81.

Weyer, U. and R. D. Possee (1991). "A baculovirus dual expression vector derived from the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus polyhedrin and p10 promoters: co-expression of two influenza virus genes in insect cells." Journal of General Virology **72** (Pt 12): 2967-2974.

White, D. O. and F. J. Fenner (1994). Medical Virology. San Diego, Academic Press, Inc.

Wickham, T. J., T. Davis, R. R. Granados, M. L. Shuler and H. A. Woods (1992). "Screening of Insect Cell Lines for the Production of Recombinant Proteins and Infectious Virus in the Baculovirus Expression System." Biotechnol. Prog. **8**: 391-396.

Wickham, T. J. and G. R. Nemerow (1993). "Optimization of Growth Methods and Recombinant Protein Production in Bti-Tn-5b1-4 Insect Cells Using the Baculovirus Expression System." Biotechnology Progress **9**(1): 25-30.

Wilson, M. E., T. H. Mainprize, P. D. Friesen and L. K. Miller (1987). "Location, Transcription, and Sequence of a Baculovirus Gene Encoding a Small Arginine-Rich Polypeptide." Journal of Virology **61**(3): 661-666.

Williams, G. V. and P. Faulkner (1996). "Replication patterns and cytopathology of cells infected with baculoviruses." Cytotechnology **20**(1-3): 95-110.

Williams, G. V. and P. Faulkner (1997). Cytological Changes and Viral Morphogenesis during Baculovirus Infection. The Baculoviruses. L. K. Miller. New York, Plenum Press: 61-108.

Williams, G. V., D. Z. Rohel, J. Kuzio and P. Faulkner (1989). "A Cytopathological Investigation of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus p10 Gene Function Using Insertion/Deletion Mutants." Journal of General Virology **70** (Pt 1): 187-202.

Wright, C. W., J. C. Means, T. Penabaz and R. J. Clem (2005). "The baculovirus anti-apoptotic protein Op-IAP does not inhibit *Drosophila* caspases or apoptosis in *Drosophila* S2 cells and instead sensitizes S2 cells to virus-induced apoptosis." Virology **335**(1): 61-71.

Wu, C. K., K. Gousset and S. H. Hughes (2007). "Targeting to the endoplasmic reticulum improves the folding of recombinant human telomerase reverse transcriptase." Protein Expr Purif **56**(1): 8-19.

Wu, H. H., J. Y. Wu, Y. W. Cheng, C. Y. Chen, M. C. Lee, Y. G. Goan and H. Lee (2010). "cIAP2 Upregulated by E6 Oncoprotein via Epidermal Growth Factor Receptor/Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT Pathway Confers Resistance to Cisplatin in Human Papillomavirus 16/18-Infected Lung Cancer." Clinical Cancer Research **16**(21): 5200-5210.

Wu, Y. and E. B. Carstens (1996). "Initiation of baculovirus DNA replication: early promoter regions can function as infection-dependent replicating sequences in a plasmid-based replication assay." Journal of Virology **70**(10): 6967-6972.

Wu, Y., G. Liu and E. B. Carstens (1999). "Replication, integration, and packaging of plasmid DNA following cotransfection with baculovirus viral DNA." Journal of Virology **73**(7): 5473-5480.

Wu, Y., Y. Wu, T. Hui, H. Wu, Y. Wu and W. Wang (2013). "Reaper homologue IBM1 in silkworm *Bombyx mori* induces apoptosis upon baculovirus infection." FEBS Letters **587**: 600-606.

Wu, Y., Y. Wu, T. Hui, H. Wu, Y. Wu and W. Wang (2013). "Reaper homologue IBM1 in silkworm *Bombyx mori* induces apoptosis upon baculovirus infection." FEBS Lett **587**(6): 600-606.

Wu, Y. L., C. P. Wu, Y. H. Huang, S. P. Huang, H. R. Lo, H. S. Chang, P. H. Lin, M. C. Wu, C. J. Chang and Y. C. Chao (2014). "Identification of a high-efficiency baculovirus DNA replication origin that functions in insect and mammalian cells." Journal of Virology **88**(22): 13073-13085.

Xiang, X., R. Yang, S. Yu, C. Cao, A. Guo, L. Chen, X. Wu, W. Cui and J. L. Cenis (2010). "Construction of a BmNPV polyhedrin-plus Bac-to-Bac baculovirus expression system for application in silkworm, *Bombyx mori*." Appl Microbiol Biotechnol **87**(1): 289-295.

Xiao, W., Y. Yang, Q. Weng, T. Lin, M. Yuan, K. Yang and Y. Pang (2009). "The role of the PI3K-Akt signal transduction pathway in *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus infection of *Spodoptera frugiperda* cells." Virology **391**: 83–89.

Xue, D. and H. R. Horvitz (1995). "Inhibition of the *Caenorhabditis elegans* cell-death protease CED-3 by a CED-3 cleavage site in baculovirus p35 protein." Nature **377**(6546): 248-251.

Xue, J., N. Qiao, W. Zhang, R. L. Cheng, X. Q. Zhang, Y. Y. Bao, Y. P. Xu, L. Z. Gu, J. D. J. Han and C. X. Zhang (2012). "Dynamic Interactions between *Bombyx mori* Nucleopolyhedrovirus and Its Host Cells Revealed by Transcriptome Analysis." Journal of virology **86**(13): 7345.

Yamada, H., M. Shibuya, M. Kobayashi and M. Ikeda (2012). "Baculovirus *Lymantria dispar* multiple nucleopolyhedrovirus IAP2 and IAP3 do not suppress apoptosis, but trigger apoptosis of insect cells in a transient expression assay." Virus Genes **45**: 370–379.

Yang, S. and L. K. Miller (1999). "Activation of Baculovirus Very Late Promoters by Interaction with Very Late Factor 1." Journal of Virology **73**(4): 3404–3409.

Yoshimori, T., T. Semba, H. Takemoto, S. Akagi, A. Yamamoto and Y. Tashiro (1990). "Protein disulfide-isomerase in rat exocrine pancreatic cells is exported from the endoplasmic reticulum despite possessing the retention signal." The Journal of Biological Chemistry **265**(26): 15984-15990.

Yu, Q. (2010). "Identification and functional analysis of the putative anti-apoptotic gene *iap4* of *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus." Virus Genes **41**: 298–304.

Yu, Q., T. Lin, G. Feng, K. Yang and Y. Pang (2008). "Functional analysis of the putative antiapoptotic genes, *p49* and *iap4*, of *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus with RNAi." Journal of General Virology **89**: 1873-1880.

Yun, E. Y., T. W. Goo, S. W. Kim, K. H. Choi, J. S. Hwang, S. W. Kang and O. Y. Kwon (2005). "Changes in cellular secretory processing during baculovirus infection." Biotechnology Letters **27**(14): 1041-1045.

Zagouras, P. and J. K. Rose (1989). "Carboxy-terminal SEKDEL Sequences Retard but Do Not Retain Two Secretory Proteins in the Endoplasmic Reticulum." The Journal of Cell Biology **109**(6 Pt 1): 2633-2640.

Zanotto, P. M., B. D. Kessing and J. E. Maruniak (1993). "Phylogenetic interrelationships among baculoviruses: evolutionary rates and host associations." J Invertebr Pathol **62**(2): 147-164.

Zhang, N., B. L. Zheng, L. Lu, Y. Zhou, S. Jiang and L. Du (2015). "Advancements in the development of subunit influenza vaccines." Microbes and Infection **17**: 123-134.

Zhou, J. and G. W. Blissard (2008). "Identification of a GP64 Subdomain Involved in Receptor Binding by Budded Virions of the baculovirus *Autographica californica* Multicapsid Nucleopolyhedrovirus." Journal of Virology **82**(9): 4449-4460.

Zhou, Q., J. F. Krebs, S. J. Snipas, A. Price, E. S. Alnemri, K. J. Tomaselli and G. S. Salvesen (1998). "Interaction of the Baculovirus Anti-apoptotic Protein p35 with Caspases. Specificity, Kinetics, and Characterization of the Caspase/p35 Complex." Biochemistry **37**(30): 10757-10765.

Zimmermann, R. and C. Mollay (1986). "Import of Honeybee Prepromelittin into the Endoplasmic Reticulum. REQUIREMENTS FOR MEMBRANE INSERTION, PROCESSING, AND SEQUESTRATION." The Journal of Biological Chemistry **261**(27): 12889-12895.

Zoog, S. J., J. J. Schiller, J. A. Wetter, N. Chejanovsky and P. D. Friesen (2002). "Baculovirus apoptotic suppressor P49 is a substrate inhibitor of initiator caspases resistant to P35 in vivo." EMBO J **21**(19): 5130-5140.

ANEXO I:
Material suplementario

1. Tablas

Género	Miembros
<i>Alphabaculoviridae</i> (73) Proteína de fusión	NPV de Lepidópteros <ul style="list-style-type: none"> • Grupo I (GP64) • Grupo II (F)
<i>Betabaculoviridae</i> (17)	GV de Lepidópteros
<i>Gammabaculoviridae</i> (3)	NPV de Himenópteros
<i>Deltabaculoviridae</i> (1)	NPV de Dípteros

Tabla S-1: Clasificación de los baculovirus (modificado de (NCBI , Rohrmann 2013), mostrando entre paréntesis el nº de ejemplares secuenciados hasta el momento.

Nombre	Patología	Compañía	Antígeno	Año de licencia*
Porcilis® Pesti	Peste Porcina Clásica (virus de la peste porcina clásica)	Merk	E2	2004
Porcilis® PCV	Circovirus porcino	Merk	ORF2 (VLP)	2004
Circumvent PCV®	Circovirus porcino	Intervet/ Schering-Plough's	ORF2	2004
Ingelvac® Circoflex	Circovirus porcino	Boehringer Ingelheim Vetmedica)	ORF2 (VLP)	2009
Cervarix®	Cáncer cuello útero	GlaxoSmithKline	L1 (VLP)	2007
Provenge®	Cáncer de próstata	Dendreon	PAP-GMCSF	2010
Glybera®	Deficiencia de la lipoproteína lipasa	UniQure	AAVv1 (Terapia génica)	2012
Flublok®	Gripe humana estacional	Protein Sciences Corp.	HA trivalente	2013
Best-H5®	Gripe aviar (A/H5N1)	Boehringer Ingelheim Vetmedica	HA	2012
Virvagen® omega**	Parvovirus canina, virus de la leucemia felina y de la inmunodeficiencia felina	Virbac	Interferón omega felino	2001

Tabla S-2: Productos recombinantes de uso veterinario y humano, producidos mediante el uso de la tecnología BEVS en infecciones de cultivos celulares de insecto o larvas de lepidópteros (*: por la FDA o la EMA, ** producido en larvas de *B.mori*, PAP-GMCSF: ácido prostático fusionado al factor estimulador de la colonización de granulocitos y macrófagos; AAVv: vector vírico adeno-asociado serotipo 1) (basada en (Cox 2012, Lopez-Vidal 2014, Palomares, Realpe et al. 2015).

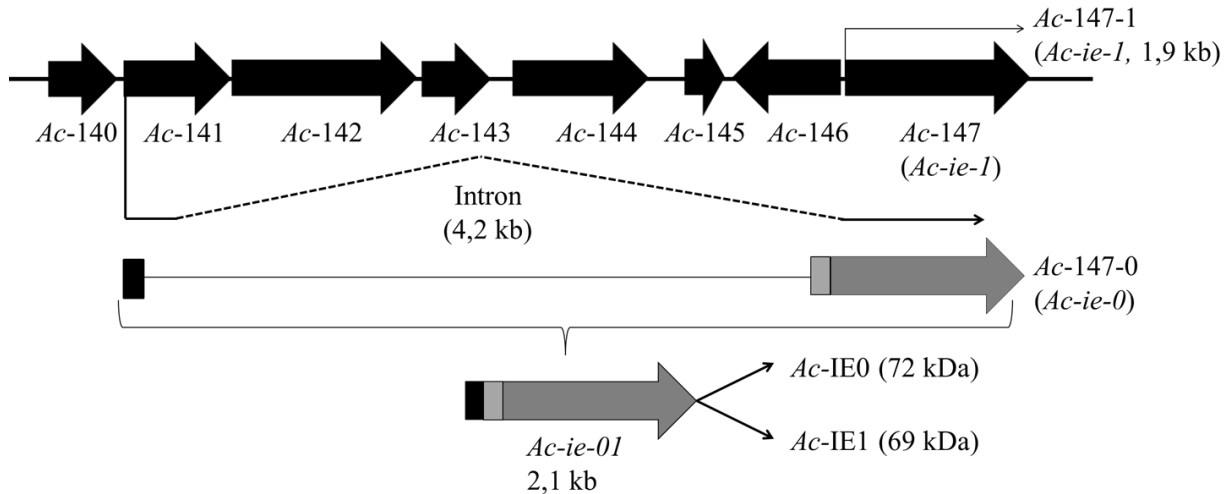


Figura S-2: Estructura del loci en el que se localiza los genes que codifican para las proteínas *Ac-IE0* y *Ac-IE1* (Adaptado de (Theilmann, Willis et al. 2001).

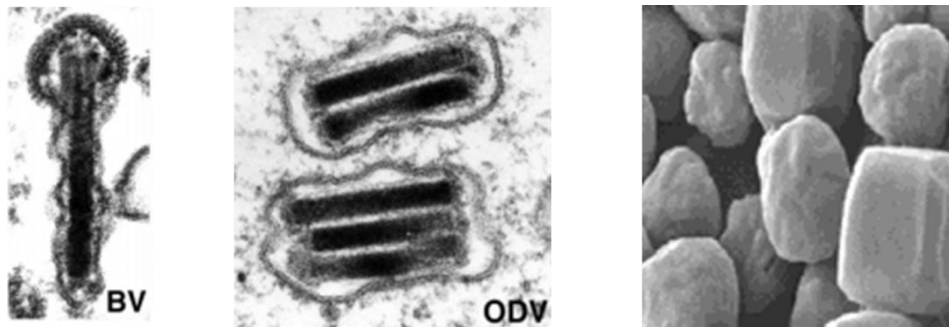


Figura S-3. Formas fenotípicas características del virion de *AcMNPV*. A) Imagen de ME representativa el virión BV (Arif, Bonning et al. 2011). B) Imagen de ME representativa de dos ODV (Arif, Bonning et al. 2011). C) Imagen de ME representativa de un conjunto de poliedros (van Oers and Vlak 2007).

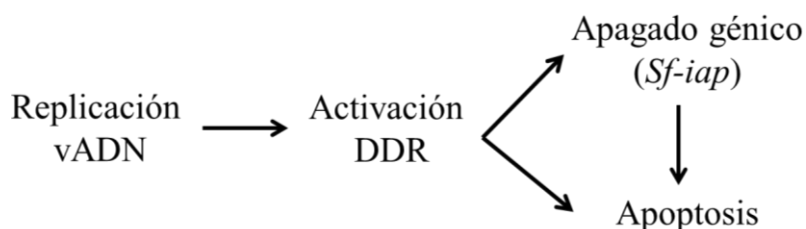


Figura S-4. Modelo de la interconexión existente entre las respuestas celulares inducidas tras la infección por baculovirus. Este modelo sostiene que para una replicación eficiente del genoma del baculovirus, se necesita la activación de la respuesta a daño en ADN (DDR), la cual a su vez dispara las respuestas de apagado génico y apoptosis. El apagado génico de ciertos genes celulares anti-apoptóticos, tales como *Sf-iap*, a su vez también provoca el disparo de la apoptosis. Adaptado de (Huang, Wu et al. 2011).

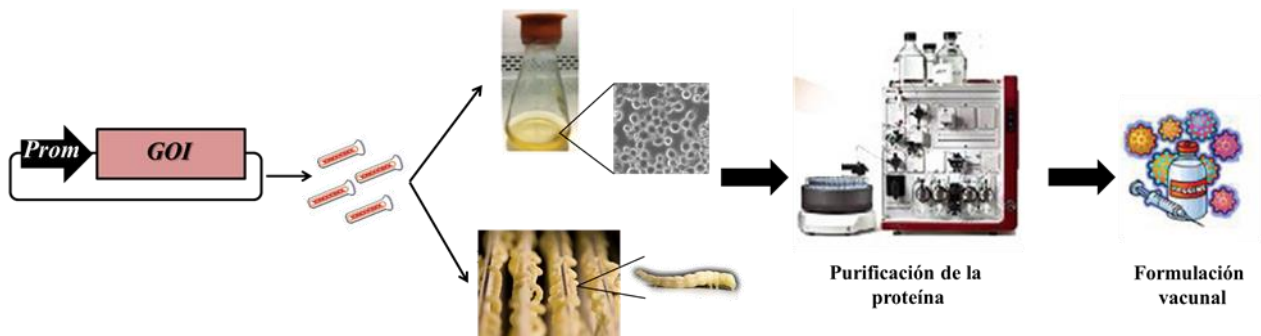


Figura S-5: Esquema de producción de una proteína recombinante de interés vacunal mediante el sistema BEVS, utilizando como plataforma productiva indistintamente cultivos celulares de insecto (A) o larvas de noctuidos (B) para ello. Tras haber clonado la secuencia genética de interés (*GOI*) Tras la recogida de la infección, el proceso de extracción, purificación y formulación de la vacuna es prácticamente similar como refleja el diagrama (modificado de (Palomares, Realpe et al. 2015).



Figura S-6: Diagrama representativo del proceso de obtención de una vacuna frente a RHDV en la actualidad. La ausencia de un sistema *in vitro* que permita la propagación eficiente de este agente etiológico que provoca la fiebre hemorrágica del conejo, ha propiciado que la producción *in vivo* sea la principal fuente del antígeno vacunal, el cual se obtiene mediante prácticas éticamente inaceptables como la inactivación química de preparaciones víricas obtenidas de los hígados de conejos infectados (Plummer y Manchester, 2011).

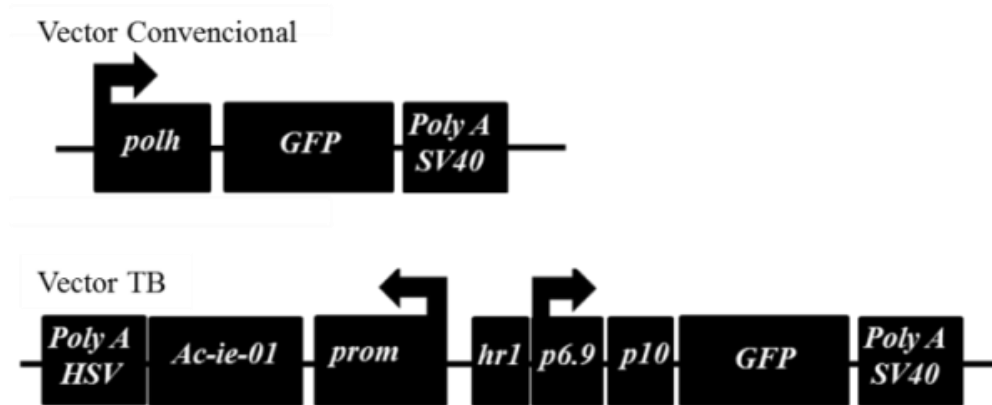


Figura S-7: Esquema de los vectores generados para el estudio de la sobre-expresión de la secuencia *Ac-ie-01*.

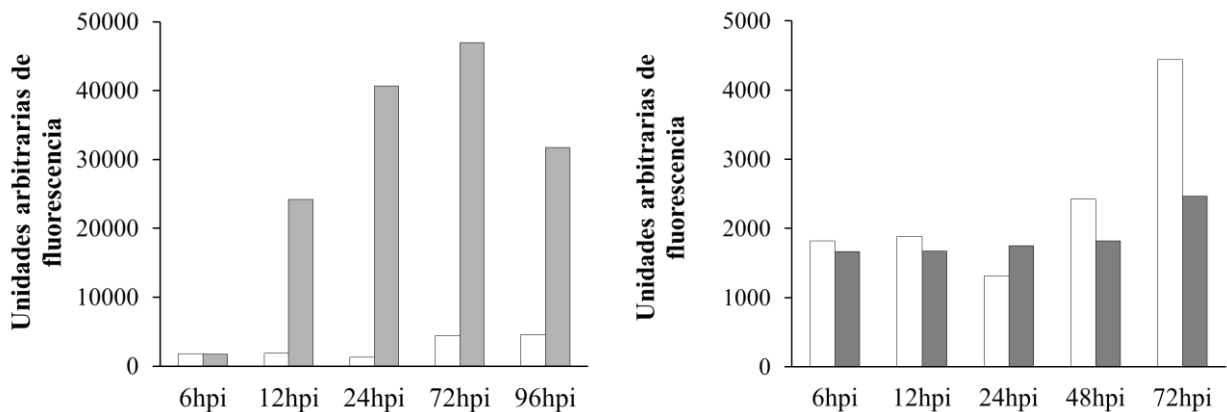


Figura S-8: Puesta a punto de la actividad caspasa efectora en células de insecto. A) Estudio de la actividad caspasa efectora en células Sf21 bajo la acción de la droga pro-apoptótica actinomicina D (barras gris claro) en comparación con un cultivo control (barras blancas), representada por unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF) derivadas del corte catalítico del sustrato utilizado en la reacción. B) Cinética de la actividad caspasa efectora en infecciones a alta MOI con el vector Convencional (barras grises), respecto a la de células control sin infectar (barras blancas).

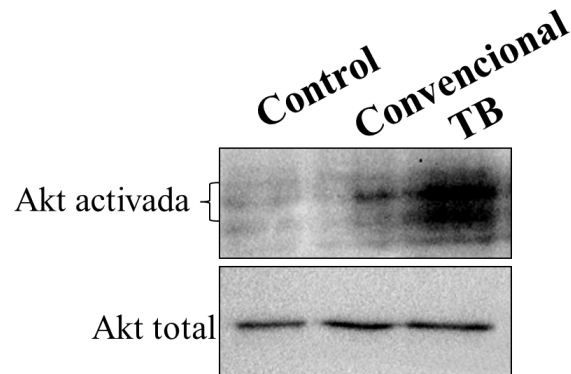


Figura S-9: Activación de la ruta de proliferación y supervivencia de Akt en células de insecto infectadas con los vectores Convencional y TB. Detección de la proteína Akt activa (fosforilada en el residuo Ser 473) mediante WB en células Sf21 no infectadas (control) o infectadas a alta MOI con el vector Convencional o el vector TB recogidas a las 2 hpi. En paralelo, se realiza la detección de Akt en las mismas muestras como control de activación de la ruta.

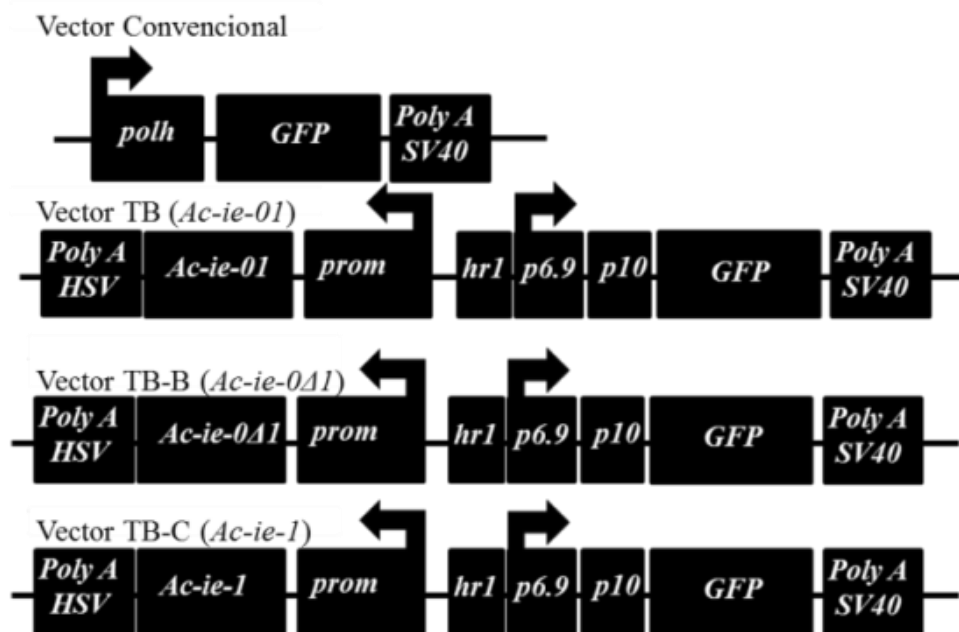


Figura S-10: Esquema de los vectores TB, TB-B y TB-C. Construcciones generadas para el estudio de la sobre-expresión de la secuencia *Ac-ie-01* en el vector TB y las versiones en las que el casete de expresión mejorado ha sido modificado con la sobre-expresión de *Ac-ie-0Δ1* (TB-B) y *Ac-ie-1* (TB-C) por separado.

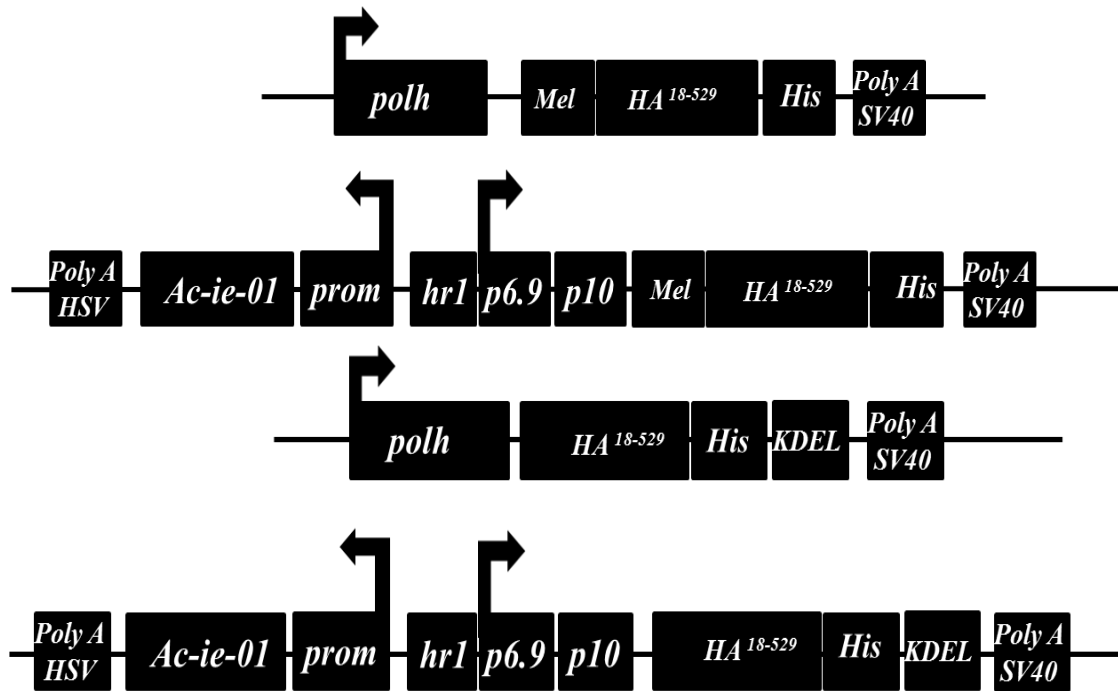


Figura S-11: Construcciones diseñadas para la expresión de la proteína HA¹⁸⁻⁵²⁹ en el sistema BEVS. Esquema de los vectores Convencional (A) y TB (B) recombinantes generados para estudiar la expresión del ectodominio de la proteína HA (HA¹⁸⁻⁵²⁹) a la que se le ha añadido una cola de histidinas en su extremo carboxilo-terminal y en conjunción con el PS-Mel, situado en su extremo amino-terminal, y de los vectores Convencional (C) y TB (D) recombinantes generados para estudiar la expresión del ectodominio de la proteína HA (HA¹⁸⁻⁵²⁹) a la que se le ha añadido una cola de histidinas en su extremo carboxilo-terminal y la señal de retención en ER, KDEL.

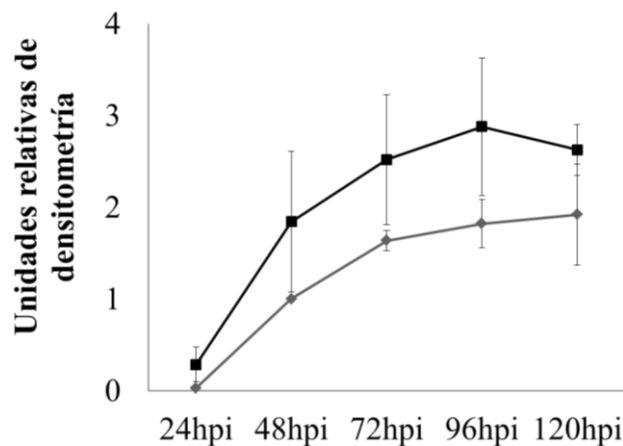


Figura S-12: Cinética de secreción de la proteína HA¹⁸⁻⁵²⁹ al medio extracelular de cultivos de células Sf9 infectadas a 0,1 MOI con los vectores Convencional o TB, representada a través de su densitometría relativa respecto a la proteína HA¹⁸⁻⁵²⁹ secretada por los cultivos infectados por el vector Convencional a las 48 hpi (n=3).

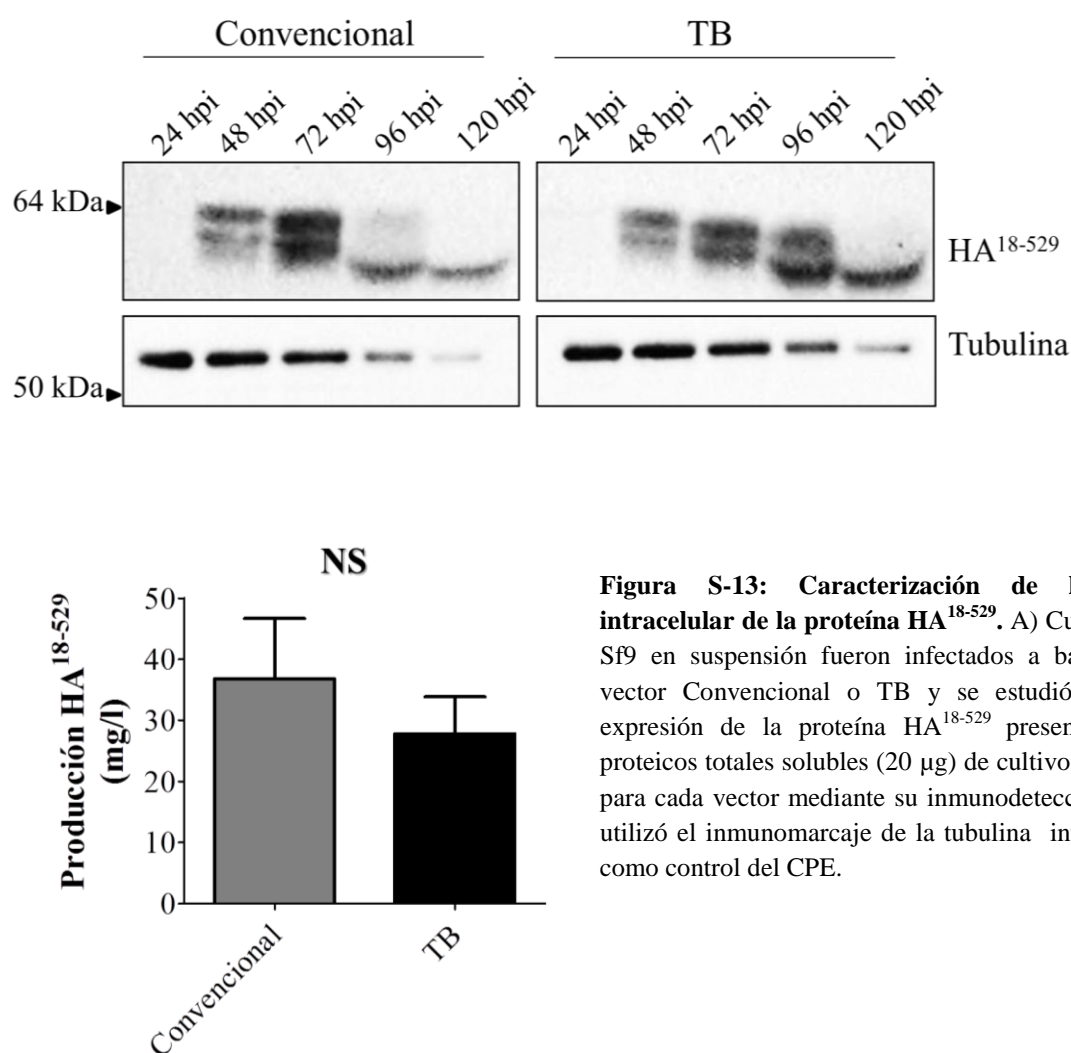


Figura S-13: Caracterización de la producción intracelular de la proteína HA¹⁸⁻⁵²⁹. A) Cultivos de células Sf9 en suspensión fueron infectados a baja MOI con el vector Convencional o TB y se estudió la cinética de expresión de la proteína HA¹⁸⁻⁵²⁹ presente en extractos proteicos totales solubles (20 µg) de cultivos representativos para cada vector mediante su inmunodetección por WB. Se utilizó el inmunomarcaje de la tubulina intracelular (5 µg) como control del CPE.

B) Cuantificación de la producción intracelular de la proteína HA¹⁸⁻⁵²⁹ en los extractos solubles de cultivos celulares infectados en las condiciones del Apartado A (n=3) a los tiempos óptimos de producción de los respectivos vectores (Convencional, 48 hpi, barra gris; TB, 72 hpi, barra negra), mediante WB junto con una curva patrón de proteína HA¹⁸⁻⁵²⁹ purificada.

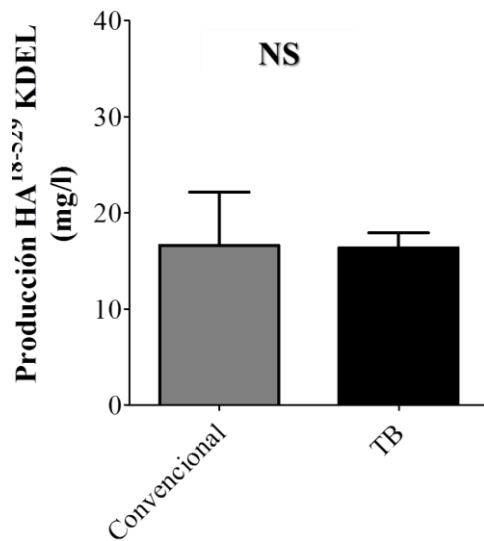
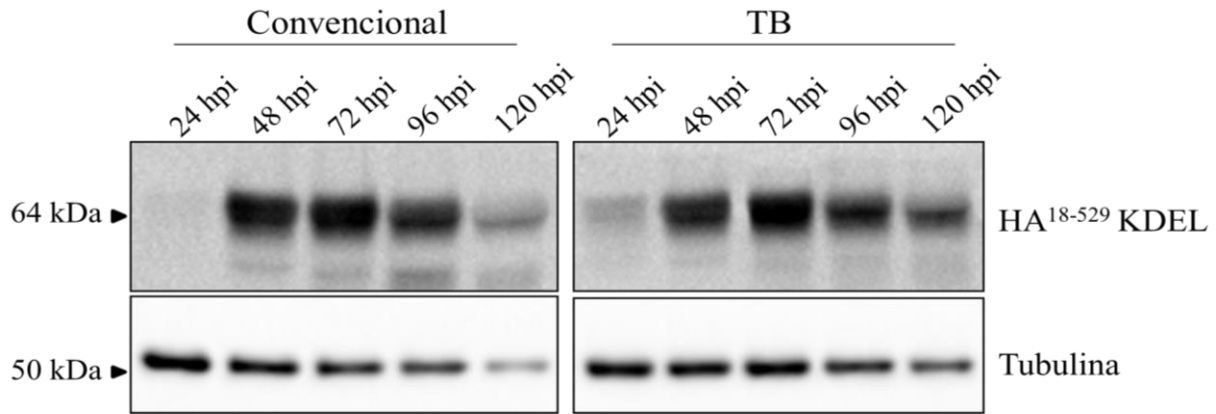


Figura S-14: Caracterización de la expresión a nivel intracelular de la proteína HA¹⁸⁻⁵²⁹KDEL en cultivos celulares en suspensión. A) Cinética de expresión de la proteína HA¹⁸⁻⁵²⁹KDEL detectada mediante inmunomarcaje en los extractos proteicos totales solubles (20 µg) representativos de células Sf9 infectadas a baja MOI con el vector Convencional o TB. La inmunodetección de la tubulina intracelular (5 µg) se emplea como control indirecto del entorno intracelular. B) Cuantificación de la producción de HA¹⁸⁻⁵²⁹KDEL en extractos proteicos totales solubles de células Sf9 infectadas según el Apartado A a los tiempos óptimos para cada vector (Convencional: 48 hpi, barra gris; TB: 72 hpi, barra negra), a través de técnicas de WB y el uso de una curva patrón (n=3).

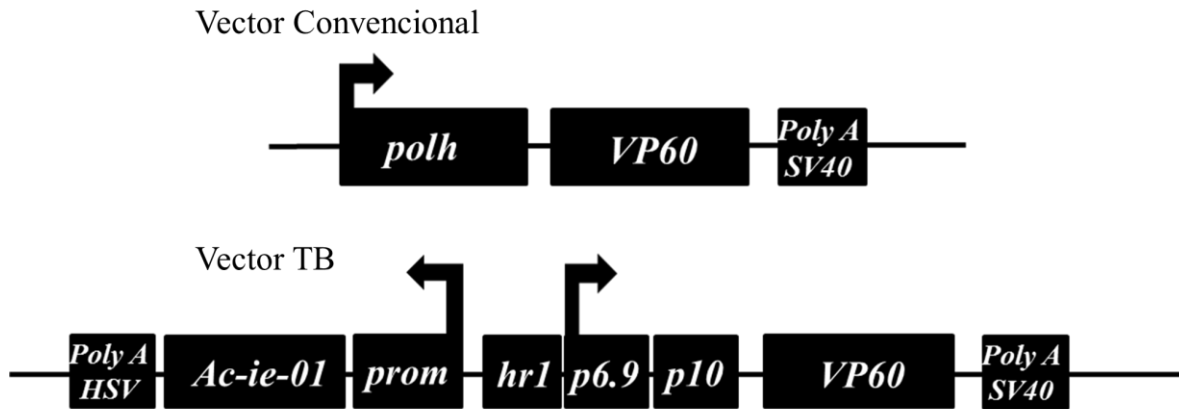


Figura S-15: Esquema de los vectores Convencional y TB recombinantes generados para estudiar la expresión de la proteína VP60 del virus RHDV.

ANEXO II:
Publicaciones